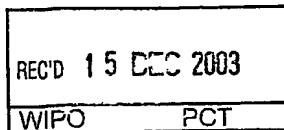


PCT/EP 03 / 09218

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 03 / 9218



EPO - Munich
83
14. Nov. 2003

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen:

102 53 112.9

Anmeldetag:

13. November 2002

Anmelder/Inhaber:

SunGene GmbH & Co. KGaA, Gatersleben/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in
genetisch veränderten Organismen

IPC:

C 12 N, C 12 P, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer

A 9161
03/00
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.
- 10 Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.
- 15 Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.
- 20 Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.
- 25 Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.
- 30 / Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Proteinsequenzen sind aus verschiedenen Organismen isoliert und annotiert worden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus *Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), aus *Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422), *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112), *Synechocystis sp. Strain PC6803* (Accession NO: NP_442491), *Bradyrhizobium sp.* (Accession NO: AF218415) und *Nostoc sp. PCC 7120* (Kaneko et al, DNA Res. 2001, 8(5), 205 - 213; Accession NO: AP003592, BAB74888).

EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtW*) aus *Agrobacterium aurantiacum* oder *Alcaligenes sp. PC-1* in Mikroorganismen.

- 5 Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwara et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343-352) und Hirschberg et al. (FEBS Letters 1995, 364, 125-128) ist es bekannt, Astaxanthin durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (*crtW*, *crtO* oder *bkt*) in *E. coli* herzustellen.

- 10 Hirschberg et al. (FEBS Letters 1997, 404, 129-134) beschreiben die Herstellung von Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtO*) aus *Haematococcus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73(5), 551-55) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Canthaxanthin führt und nur Spuren Astaxanthin liefert.

- 15 WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18(8), 888-892) beschreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (*crtO*) in Tabak.

- 20 WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.

- 25 Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen eine große Menge an hydroxylierten Nebenprodukten, wie beispielsweise Zeaxanthin und Adonixanthin liefern.

- 30 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.

- 35 Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität

von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vorzugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie
5 beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage versetzt werden, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocarotinoid wie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, *Adonisröschen*, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea* wei-
15 sen bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Ketolaseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine
20 Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder Ausgangsorganismus.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.
25

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.
30

Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.
35

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, be-

vorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

5 Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus verstanden.

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

10

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

15

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

20 Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Blakeslea*.

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

25

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

30

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

35

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismen-Extrakten wird mit den Substraten β -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat)

bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

5 Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

10 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endo-
15 genen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiolo-
20 gische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.
25

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.
30

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
35

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleite-

te Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

5 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

10 In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine
15 Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.

20 In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser
25 Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz
30 SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.

Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäuren, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität

von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

5 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu Ketocarotinoiden mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwendeten Ketolase-Gene.

10 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

15 Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20 Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

25 *Nostoc sp. Strain PCC7120* (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Nostoc punctiforme ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 3); Protein: Acc.-No. ZP_00111258 (SEQ ID NO: 4) (als putatives Protein annotiert) oder

30 *Nostoc punctiforme ATTC 29133*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 5), Protein: (SEQ ID NO: 6) (nicht annotiert),

35 *Synechococcus sp. WH 8102*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 46), Protein: Acc.-No. ZP_00115639 (SEQ ID NO: 47) (als putatives Protein annotiert),

oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen wie beispielsweise

die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 8 oder 10 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 3 hervorgehen,

- 5 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder 14 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 6 bzw. SEQ ID NO: 5 hervorgehen, oder

- 10 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 49 oder 51 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 48 oder SEQ ID NO: 50, die beispielsweise durch Variation bzw. Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 46 hervorgehen.

- 15 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

- 20 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 25 Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

- 30 Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

- 35 Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt
5 bei 42°C ausgeführt.

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

- (1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel
- 10 (i) 4X SSC bei 65°C, oder
- (ii) 6X SSC bei 45°C, oder
- 15 (iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischesperma-DNA, oder
- (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- 20 (v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- 25 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- 30 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschrift für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder
- 35 (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder
- (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- 5 (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

10 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 98 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist.

15 Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

25 Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

30 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

35 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode

(Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- 5 Multiple alignment parameter:
- | | |
|------------------------------|-----|
| Gap opening penalty | 10 |
| Gap extension penalty | 10 |
| Gap separation penalty range | 8 |
| Gap separation penalty | off |
- 10 % identity for alignment delay 40
- | | |
|-------------------------|-----|
| Residue specific gaps | off |
| Hydrophilic residue gap | off |
| Transition weighing | 0 |
- 15 Pairwise alignment parameter:
- FAST algorithm on
- | | |
|--------------|---|
| K-tuple size | 1 |
| Gap penalty | 3 |
| Window size | 5 |
- 20 Number of best diagonals 5

- 25 Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42 % aufweist.

- 30 Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 65% auf.

- Die Sequenz der zweiten Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 6) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 58% auf.

- 35 Die Sequenz der Ketolase aus *Synechococcus sp. WH 8102* (SEQ ID NO: 47) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 44% auf.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1, in den Organismus ein.

- 15 Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 20 Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden eine Identität von 39% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 40% (*Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422) und 20 bis 21 % (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.

- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

- 35 Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

5 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

20 Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.

25 Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.

30 Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge an Lycopin bzw. γ -Carotin oder die gebildete Menge an γ -Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an β -Carotin aus γ -Carotin erhöht.

35 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie β -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.
- 10 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):
- 15 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreductase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg β -Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C
- 20 inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 25 Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.
- 30

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der β -Cyclase -Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

35

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organismusextrakt, 20 nM Lyco-

pin, 250 µg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

10 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.

15 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von
20 einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.

25 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden.

30 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

- 5 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.

- 15 Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase kodiert, verwendet werden.

- 20 Bei genomischen Hydroxylase-bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

- 25 Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein: SEQ ID NO: 16).

- 30 Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

- In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen vor.

- 35 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodie-

rend eine β -Cyclase, auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

10

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 16 leicht auffinden.

15

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 15 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

20

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 16.

25 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

30 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 15, in den Organismus ein.

35

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-

säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

5

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 18 leicht auffinden.

10

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

15

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 18.

20 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

25

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

30

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A

35

laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organismen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

5

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen und

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

15

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei oder drei der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

20

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

25

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

30

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

35

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung

Synechocystis.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Astera-ceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Ma-

rigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, Tropaeolum oder Adonis.

- 5 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

- 10 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

- 15 Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40°C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von
20 etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolaseexpression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

- 25 Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

- 30 Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

- 35 Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus

den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

5 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

10 Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

15 Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäure-ester an.

20 In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

25 Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengewebe, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzugte Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter, Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

30 In einer besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

35 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

In einer weiteren, besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

5

In einer weiteren, besonderes bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

10 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

15

Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres Transitpeptid.

20 Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

25

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

30

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

35

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202), den Triose-Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana* Acc.-No. AB006698, Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promoter aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promotor (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolphi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz

et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

- Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und
5 wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.
- 10 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.
- 15 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombinationen hieraus.
- 20 Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus
25 Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).
- Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO
30 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific carotenoid-associated protein (CHRC) gene promoter aus Cucumis sativus Acc.-No. AF099501, Basenpaar 1 bis 1532), der EPSP_Synthase Promotor (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus Petunia hybrida, Acc.-No. M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor
35 (Phytoene desaturase gene promoter aus Solanum lycopersicum, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus Petunia hybrida, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding Protein 1 gene promoter aus Petunia hybrida, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

5 Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378; US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

10 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

15 Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz
20 SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten
25 Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
30 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

35 Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das

die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

- 5 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.
- 10 Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

15

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
20 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGATCC_BamHI

pTP10

25

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGCTGGATCC_BamHI

30 pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
35 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGATCC_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der

kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

- 5 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.
- 10 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.
- 15 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
- 20 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-
- 25 Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.
- 30 Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).
- 35

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

5

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

15 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

20

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.

25

30

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

35

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

- Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder β -Hydroxylase oder β -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2 oder die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P₇P₁-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulato-

rischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

5

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, β -Hydroxylase oder β -Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

15

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

25

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

30

Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89) oder pBluescript und pUC-Vektoren.

35

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88

(Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind
5 in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol.. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.
15

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.
20

Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.
25

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.
30

Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enhaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche
35

präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

- Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-
- 5 Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem.

- Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell ver-
- 10 knüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus
- 15 einführt.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

- 20 A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

25

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30

- Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 35

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Ein-

bringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogene Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogene Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphothea*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*,

Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, Tropaeolum* oder *Adonis*.

10

Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen *Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Adonis, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium* oder *Tropaeolum*, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

15

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

25

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

30

Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoidhaltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

35

Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

10

Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese kodieren.

15

Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

20

Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 6 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

25

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

30

35

Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60%, be-

sonders bevorzugt mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 47 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenz SEQ ID NO: 5 enthält.

10 Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ.
15 ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise
20 mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise
25 mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist,
30 eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise
35 mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Menge an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5

- g/l NaNO₃, 0.04 g/l K₂PO₄·3H₂O, 0.075 g/l MgSO₄·H₂O, 0.036 g/l CaCl₂·2H₂O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na₂CO₃, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H₃BO₃, 1.81 g/l MnCl₂·4H₂O, 0.222 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0.39 g/l NaMoO₄·2H₂O, 0.079 g/l CuSO₄·5H₂O, 0.0494 g/l Co(NO₃)₂·6H₂O)
- 5 gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc* PCC7120:

- 10 Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) re-suspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C
- 15 inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur
- 20 getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

- Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc* PCC 7120, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc* PCC 7120 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 19) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG SEQ ID No.
- 25 20) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 30

- 1 µl einer *Nostoc* PCC 7120 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 19)
- 35 - 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 20)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

| | | | |
|---|-----|------|------------|
| | 1X | 94°C | 2 Minuten |
| | 35X | 94°C | 1 Minute |
| 5 | | 55°C | 1 Minuten |
| | | 72°C | 3 Minuten |
| | 1X | 72°C | 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 19 und SEQ ID No. 20 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 21). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc PCC 7120*.

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guérineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

Beispiel 2:

Konstruktion des Plasmides pMCL-CrtYIBZ/idi/gps für die Synthese von Zeaxanthin in *E. coli*

Die Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps erfolgte in drei Schritten über die Zwischenstufen pMCL-CrtYIBZ und pMCL-CrtYIBZ/idi. Als Vektor wurde das mit high-copy-number Vektoren kompatible Plasmid pMCL200 verwendet (Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y. und Koga, T.; Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors; Gene 162 (1995), 157-158).

Beispiel 2.1.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ

Die Biosynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtZ* entstammen dem Bakterium *Erwinia uredovora* und wurden mittels PCR amplifiziert. Genomische DNA von *Erwinia uredovora* (DSM 30080) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Roche, Long Template PCR: Procedure for

amplification of 5-20 kb targets with the expand long template PCR system). Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des Biosynthesecusters von *Erwinia uredovora* waren die folgenden:

5 Master Mix 1:

- 1.75 µl dNTPs (Endkonzentration 350 µM)
 - 0.3 µM Primer Crt1 (SEQ ID No. 22)
 - 0.3 µM Primer Crt2 (SEQ ID No. 23)
 - 10 - 250 – 500 ng genomische DNA von DSM 30080
- Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

Master Mix 2:

- 15 - 5 µl 10x PCR Puffer 1 (Endkonzentration 1x, mit 1.75 mM Mg²⁺)
 - 10x PCR Puffer 2 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg²⁺)
 - 10x PCR Puffer 3 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg²⁺)
 - 0.75 µl Expand Long Template Enzyme Mix (Endkonzentration 2.6 Units)
- Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

20

Die beiden Ansätze "Master Mix 1" und "Master Mix 2" wurden zusammenpipetiert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|----|-----|------|-------------|
| 25 | 1X | 94°C | 2 Minuten |
| | 30X | 94°C | 30 Sekunden |
| | | 58°C | 1 Minute |
| | | 68°C | 4 Minuten |
| | 1X | 72°C | 10 Minuten |

30

- Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 22 und SEQ ID No. 23 resultierte in einem Fragment (SEQ ID NO: 24), das für die Gene *CrtY* (Protein: SEQ ID NO: 25), *CrtI* (Protein: SEQ ID NO: 26), *crtB* (Protein: SEQ ID NO: 27) und *CrtZ* (*idNA*) kodiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und
- 35 der Klon pCR2.1-CrtYIBZ erhalten.

Das Plasmid pCR2.1-CrtYIBZ wurde Sall und HindIII geschnitten, das resultierende Sall/HindIII-Fragment isoliert und durch Ligierung in den Sall/HindIII geschnittenen Vektor pMCL200 transfe-

riert. Das in pMCL 200 klonierte Sall/HindIII Fragment aus pCR2.1-CrtYIBZ ist 4624 Bp lang, kodiert für die Gene *CrtY*, *CrtI*, *crtB* und *CrtZ* und entspricht der Sequenz von Position 2295 bis 6918 in D90087 (SEQ ID No. 24). Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ.

5 Beispiel 2.2.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi

Das Gen *idi* (Isopentenylidiphosphat-Isomerase; IPP-Isomerase) wurde aus *E. coli* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend das gesamte *idi* Gen mit *idi*-Promotor und Ribosomenbindestelle, wurde aus *E. coli* mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-*idi* SEQ ID No. 28) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-*idi* SEQ ID No. 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

15 Die PCR zur Amplifikation der DNA erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *E. coli* TOP10- Suspension
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-*idi* (SEQ ID No. 28)
- 20 - 0.2 mM 3'-*idi* (SEQ ID No. 29)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | |
|-----|-------|------------|
| 1X | 94°C | 2 Minuten |
| 20X | 94°C | 1 Minute |
| | 62 °C | 1 Minute |
| 30 | 72°C | 1 Minute |
| 1X | 72°C | 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 679 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 30). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-*idi* erhalten.

35

Sequenzierung des Klon pCR2.1-idi bestätigte eine Sequenz, die sich nicht von der publizierten Sequenz AE000372 in Position 8774 bis Position 9440 unterscheidet. Diese Region umfaßt die Promotor-Region, die potentielle Ribosomenbindestelle und den gesamten "open reading frame" für die IPP-Isomerase. Das in pCR2.1-idi klonierte Fragment hat durch das Einfügen einer XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer Sall-Schnittstelle am 3'-Ende des *idi*-Gens eine Gesamtlänge von 679 Bp.

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung des *idi*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des XhoI/Sall-Fragmentes aus pCR2.1-idi und Ligierung in den XhoI/Sall geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/*idi*.

Beispiel 2.3.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/*idi*/*gps*

Das Gen *gps* (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase; ; GGPP-Synthase) wurde aus *Archaeoglobus fulgidus* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend *gps* aus *Archaeoglobus fulgidus*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-*gps* SEQ ID No. 32) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-*gps* SEQ ID No. 33) amplifiziert.

Die DNA von *Archaeoglobus fulgidus* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein GGPP-Synthase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *Archaeoglobus fulgidus*-DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-*gps* (SEQ ID No. 32)
- 0.2 mM 3'-*gps* (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

| | | |
|-----|------|-----------|
| 1X | 94°C | 2 Minuten |
| 20X | 94°C | 1 Minute |

56°C 1 Minute
72°C 1 Minute
1X 72°C 10 Minuten

- 5 Das mittels PCR und den Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 amplifizierte DNA-Fragment wurde mit an sich bekannten Methoden aus dem Agarosegel eluiert und mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII geschnitten. Daraus resultiert ein 962 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 34). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das NcoI/HindIII geschnittene Amplifikat in den Vektor
- 10 pCB97-30 kloniert und der Klon pCB-gps erhalten.

- 15 Sequenzierung des Klons pCB-gps bestätigte eine Sequenz für die GGPP-Synthase aus *A. fulgidus*, die sich von der publizierten Sequenz AF120272 in einem Nukleotid unterscheidet. Durch das Einfügen einer NcoI-Schnittstelle im *gps*-Gen wurde das zweite Kodon der GGPP-Synthase verändert. In der publizierten Sequenz AF120272 kodiert CTG (Position 4-6) für Leucin. Durch die Amplifikation mit den beiden Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 wurde dieses zweite Kodon in GTG verändert, welches für Valin kodiert.

- 20 Der Klon pCB-gps wurde daher für die Klonierung des *gps*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des KpnI/XhoI-Fragmentes aus pCB-gps und Ligierung in den KpnI und XhoI geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi. Das klonierte KpnI/XhoI-Fragment (SEQ ID No. 34) trägt den Prm16-Promotor zusammen mit einer minimalen 5'-UTR-Sequenz von *rbcl*, den ersten 6 Kodons von *rbcl*, die die GGPP-Synthase N-terminal verlängern, und 3' vom *gps*-Gen die *psbA*-Sequenz. Der N-Terminus der GGPP-
- 25 Synthase hat somit anstelle der natürlichen Aminosäure-Abfolge mit Met-Leu-Lys-Glu (Aminosäure 1 bis 4 aus AF120272) die veränderte Aminosäure-Abfolge Met-Thr-Pro-Gln-Thr-Ala-Met-Val-Lys-Glu. Daraus resultiert, dass die rekombinante GGPP-Synthase, beginnend mit Lys in Position 3 (in AF120272) identisch ist und keine weiteren Änderungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Die *rbcl*- und *psbA*-Sequenzen wurden gemäß einer Referenz nach Eibl et al.
- 30 (Plant J. 19. (1999), 1-13) verwendet. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi/gps.

Beispiel 3:

Biotransformation von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli*-Stämmen

- 35 Zur Zeaxanthin-Biotransformation wurden rekombinante *E. coli*-Stämme hergestellt, welche durch heterologe Komplementation zur Zeaxanthin-Produktion befähigt sind. Stämme von *E. coli* TOP10 wurden als Wirtszellen für die Komplementations-Experimente mit den Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps verwendet.

Um *E. coli*-Stämme herzustellen, die die Synthese von Zeaxanthin in hoher Konzentration ermöglichen, wurde das Plasmid pMCL-CrtYIBZ/idi/gps konstruiert. Das Plasmid trägt die Biosynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtY* von *Erwinia uredovora*, das Gen *gps* (für Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase) aus *Archaeoglobus fulgidus* und das Gen *idi* (Isopentenylidiphosphat-Isomerase) aus *E. coli*. Mit diesem Konstrukt wurden limitierende Schritte für eine hohe Akkumulation von Carotinoiden und deren biosynthetischen Vorstufen beseitigt. Dies wurde zuvor von Wang et al. in ähnlicher Weise mit mehreren Plasmiden beschrieben (Wang, C.-W., Oh, M.-K. und Liao, J.C.; Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering* 62 (1999), 235-241).

10

Kulturen von *E. coli* TOP10 wurden in an sich bekannter Weise mit den beiden Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformiert und in LB-Medium bei 30°C bzw. 37°C über Nacht kultiviert. Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) und Isopropyl-β-thiogalactosid (1 mmol) wurden in an sich üblicher Weise ebenfalls über Nacht zugegeben.

15

Zur Isolierung der Carotinoide aus den rekombinanten Stämmen wurden die Zellen mit Aceton extrahiert, das organische Lösungsmittel zur Trockne eingedampft und die Carotinoide mittels HPLC über eine C30-Säule aufgetrennt. Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

20

Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

25

Gradientprofil:

| Zeit | Flussrate | % Laufmittel A | % Laufmittel B | % Laufmittel C |
|-------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| 1.00 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |
| 1.05 | 1.0 | 80.0 | 5.0 | 15.0 |
| 14.00 | 1.0 | 42.0 | 5.0 | 53.0 |
| 14.05 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |
| 17.00 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |
| 18.00 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |

Detektion: 300 - 500 nm

30

Die Spektren wurden direkt aus den Elutionspeaks unter Verwendung eines Photodiodenarray-detektors bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionsspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben identifiziert.

- 5 Abbildung 1 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Es zeigt sich, daß dieser Stamm aufgrund der heterologen Komplementation verschiedene Ketocarotinoide synthetisieren kann. Mit zunehmender Retentionszeit werden Astaxanthin (Peak 1), Adonirubin (Peak 2) und Canthaxanthin (Peak 3) eluiert.

10

Beispiel 3.1

Vergleichsbeispiel

15

Analog zu den vorhergehenden Beispielen wurde als Vergleichsbeispiel ein *E.coli*-Stamm hergestellt, der eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille exprimiert. Dazu wurde die cDNA die für die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert amplifiziert und gemäß Beispiel 1 in den gleichen Expressionsvektor kloniert.

20

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert. Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*- Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l $FeSO_4 \cdot xH_2O$) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert.

25

30

Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

35

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers PR1

(gcaagctcga cagctacaaa cc) in cDNA umgeschrieben.

- Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers PR2 (gaagcatgca gctagcagcg acag) und eines antisense spezifischen Primers PR1 amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1
- 0.2 mM PR2
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94_C 2 Minuten
 35X 94_C 1 Minute
 25 53_C 2 Minuten
 72_C 3 Minuten
 1X 72_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert:

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| gaagcatgca | gctagcagcg | acagtaaatgt | tggagcagct | taccggaagc | gctgaggcac | 60 |
| tcaaggagaa | ggagaaggag | gttgcaggca | gctctgacgt | gttgcgtaga | tgggagaccc | 120 |
| agtactcgct | tccgtcagag | gagtcagacg | cggcccgcgc | gggactgaag | aatgcctaca | 180 |
| agccaccacc | ttccgacaca | aagggcacat | caatggcgct | agctgtcatc | ggctcctggg | 240 |
| ccgcagtggt | cctccacgcc | atctttcaaa | tcaagcttcc | gacctccttg | gaccagctgc | 300 |
| actggctgcc | cgtgtcagat | gccacagctc | agctgggttag | cggcagcagc | agcctgctgc | 360 |
| acatcgctcg | agtattcttt | gtcctggagt | tcctgtacac | aggccttttt | atcaccacgc | 420 |
| atgatgctat | gcatggcacc | atcgccatga | gaaacaggca | gcttaatgac | ttcttgggca | 480 |
| gagtatgcat | ctccttgtag | gcctgggttg | attacaacat | gctgcacgcg | aagcattggg | 540 |
| agcaccacaa | ccacactggc | gaggtgggca | aggaccctga | cttccacagg | ggaaaccctg | 600 |
| gcattgtgcc | ctgggttgcc | agcttcatgt | ccagctacat | gtcgatgtgg | cagtttgccg | 660 |
| gcctcgcatg | gtggacggtg | gtcatgcagc | tgctgggtgc | gccaatggcg | aacctgctgg | 720 |
| tgttcatggc | ggccgcgccc | atcctgtccg | ccttcgcgtt | gttctacttt | ggcacgtaca | 780 |
| tgcccccaca | gcctgagcct | ggcgccgcgt | caggctcttc | accagccgtc | atgaactggt | 840 |
| ggaagtcgcg | cactagccag | gcgtccgacc | tggtcagctt | tctgacctgc | taccacttcg | 900 |
| acctgcactg | ggagcaccac | cgctggccct | ttgccccctg | gtgggagctg | cccaactgcc | 960 |

```

gccgcctgtc tggccgaggt ctggttcctg cctagctgga cacactgcag tgggccttgc 1020
tgccagctgg gcatgcaggt tgtggcagga ctgggtgagg tgaaaagctg caggcgctgc 1080
tgccggacac gctgcatggg ctaccctgtg tagctgccgc cactagggga gggggtttgt 1140
agctgtcgag cttgc

```

5

Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

- 10 Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80.

15

Dieser Klon wurde für die Klonierung in den unter Beispiel 1 beschriebenen Expressionsvektor verwendet. Die Klonierung erfolgte analog wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Transformation der *E. coli* Stämme, deren Kultivierung und die Analyse des Carotinoidprofils erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben.

20

Abbildung 2 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit diesem Expressionsvektor und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Unter Verwendung einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*, wie beispielsweise in EP 725137 beschrieben, eluieren mit zunehmender Retentionszeit Astaxanthin (Peak 1), Adonixanthin (Peak 2) und nicht umgesetztes Zeaxanthin (Peak 3). Dieses Carotinoidprofil wurde bereits in EP 0725137 beschrieben.

25

Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der bakteriell produzierten Carotinoidmengen:

30

- 35 Tabelle 1: Vergleich der bakteriellen Ketocarotinoid-Synthese bei Verwendung zweier verschiedener Ketolasen, der erfindungsgemäßen Ketolase aus *Nostoc* sp. Strain PCC7120 (Beispiel 3) und der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als Vergleichsbeispiel (Beispiel 3.1). Carotinoidmengen sind in ng/ ml Kulturflüssigkeit angegeben.

| Ketolase aus | Astaxanthin | Adonirubin | Adonixanthin | Canthaxanthin | Zeaxanthin |
|---|-------------|------------|--------------|---------------|------------|
| <i>Haematococcus pluvialis</i> | 13 | | 102 | | 738 |
| <i>Flotow em. Wille</i> (Vergleichsbeispiel) | | | | | |

| | | | | | |
|-------------------------------------|-----|-----|--|-----|--|
| <i>Nostoc</i> sp. Strain PCC7120 | 491 | 186 | | 120 | |
|-------------------------------------|-----|-----|--|-----|--|

Die erfindungsgemäße Expression der Ketolase aus *Nostoc* sp. Strain PCC7120 führt zu einem Carotinoidmuster, welches sich von dem Carotinoidmuster nach Expression einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* deutlich unterscheidet. Während die Ketolase aus dem Stand der Technik nur sehr unvollständig das gewünschte Ketocarotinoid Astaxanthin liefert, ist Astaxanthin bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Ketolase das Hauptprodukt. Im erfindungsgemäßen Verfahren treten hydroxylierte Nebenprodukte in einer deutlich geringeren Menge auf.

10 Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc* sp. PCC 7120 Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferrodoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.38) und FNR-2 (SEQ ID No. 39) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

25

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 30 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 38)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 39)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 35 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

| | | |
|-----|------|------------|
| 1X | 94°C | 2 Minuten |
| 35X | 94°C | 1 Minute |
| 5 | 50°C | 1 Minute |
| | 72°C | 1 Minute |
| 1X | 72°C | 10 Minuten |

Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferrodoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium* vermittelte Transformation der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment *FNR-Promotor* den FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS TransitPeptid* das *rbcS* Transitpeptid aus *Erbse* (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die

Nostoc Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwen-

5 dnung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment (partielle *SacI* Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment *FNR Pro-*

10 *motor* den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS Transit Peptid* das *rbcS* Transit-peptid aus Erbse (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungs-signal von CaMV.

15 Beispiel 5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem

20 Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Develop-ment 125: 1711-1721).

25 Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.41) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) hergestellt.

30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35
- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
 - 0.25 mM dNTPs
 - 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
 - 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)

- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5

| | | |
|-----|------|-----------------|
| 1X | 94°C | 2 Minuten |
| 35X | 94°C | 1 Minute |
| | 50°C | 1 Minute |
| | 72°C | 1 Minute |
| 10 | 1X | 72°C 10 Minuten |

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

- 15 Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten Arabidopsis thaliana Pflanzen.
- 20

- Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 41) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 44) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 43) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) amplifiziert (Amplifikat A2/3).
- 25

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 35 - 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 41 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 43)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 44 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)

- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5 1X 94°C 2 Minuten
35X 94°C 1 Minute
 50°C 1 Minute
 72°C 1 Minute
1X 72°C 10 Minuten

10

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und

15 Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

20

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
 - 2 µl 1X Klenow Puffer
 - 2U Klenow Enzym

30

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 41) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 42) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

35

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 5 - 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|----|-----|------|------------|
| 10 | 1X | 94°C | 2 Minuten |
| | 35X | 94°C | 1 Minute |
| | | 50°C | 1 Minute |
| | | 72°C | 1 Minute |
| | 1X | 72°C | 10 Minuten |

15

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 41 (AP3-1) und SEQ ID No. 42 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

20

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PNOST.

30

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PNOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJAP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment AP3P den

modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 5 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PNOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

15

Beispiel 6:

Herstellung transgener Lycopersicon esculentum Pflanzen

- 20 Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

- 25 Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2% Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20 - 100 µE) statt.
- 30 Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 - 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobacterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3FNRNOST und pS3AP3NOST transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3FNRNOST und pS3AP3NOST transformierten Agrobacterium-Stämmen wurde jeweils eine
- 35 Übernachtkultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 °C kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3% Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier ge-

trocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3% Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 - 100 µE, Lichtrhythmus 16h/8h) aufbewahrt. 5
Aller zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3% Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

10

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

15 Mit pS3FNRNOST wurde erhalten: ms 101-1, ms101-2, ms101-3

Mit pS3AP3NOST wurde erhalten: ms 102-1, ms102-2, ms102-3

Beispiel 7:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

20

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2% Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18-28°C/20-200 µE/3 - 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20-70 µE, für 4-8 Wochen.

25

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 - 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS - Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

30

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (pS5FNRNOST und pS5AP3NOST), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension 35

durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird fuer die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

- 5 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakterien-suspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestig-
10 tes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Ta-
ge statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 – 80 $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$, Temperatur: 22 – 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen
15 Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu ver-
20 wendenden Verfahrens sind denkbar.

- Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sproßknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium ein-
25 schließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, näm-lich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

- Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:
30 Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 - 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Da-
35 durch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

Die Zugabe von AgNO₃ (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

- 5 Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

- 10 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3

- 15 Beispiel 9
Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel 9.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

- 20 Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100-200 µl Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

- 25 Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.
- 30

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 µl Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

- 35 Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

5 Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

| Zeit | Flussrate | % Laufmittel A | % Laufmittel B | % Laufmittel C |
|------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| 12.0 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |
| 12.1 | 1.0 | 80.0 | 5.0 | 15.0 |
| 22.0 | 1.0 | 76.0 | 5.0 | 19.0 |
| 22.0 | 1.0 | 66.5 | 5.0 | 28.5 |
| 38.0 | 1.0 | 15.0 | 5.0 | 80.0 |
| 45.0 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |
| 46.0 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |
| 46.1 | 1.0 | 95.0 | 5.0 | 0 |

10 Detektion: 300 - 500 nm

Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen wird gemörstert und mit Aceton extrahiert.

15 Extrahierte Carotinoide werden mittels TLC aufgetrennt. In den Linien können Mono- und Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester sind in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

Beispiel 10

20 Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

Allgemeine Arbeitsvorschrift

25 Gemörstertes Petalenmaterial (30-100 mg Frischgewicht) wird mit 100% Aceton (dreimal 500ul; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 495 ul Aceton aufgenommen, 4,95 ml Kalium-phosphatpuffer (100 mM, pH7.4) zugegeben und gut gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von ca. 17 mg Bile-Salze (Sigma) und 149 µl einer NaCl/CaCl₂-Lösung (3M NaCl und 75 mM CaCl₂). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester wird 595 µl

einer Lipaselösung (50 mg/ml Lipase Typ7 von *Candida rugosa*(Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach etwa 21 Stunden erfolgte nochmals eine Zugabe von 595 µl Lipase mit erneuter Inkubation von mindestens 5 Stunden bei 37°C. Anschließend werden etwa ca. 700 mg Na₂SO₄·10H₂O in der Lösung gelöst. Nach Zugabe von 1800 µl Petrolether werden 5 die Carotinoide durch kräftig Mischen in die organische Phase extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase farblos bleibt. Die Petroletherfraktionen werden vereinigt und der Petrolether evaporiert. Freie Carotinoide werden in 100-120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch

2

Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität, aufweisen.
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase in den Organismus einbringt.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 aufweist.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
- 35 14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine β -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.

3

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Organismen isoliert.
- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung oder Umregulierung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.
- 20 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Phaffia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Pflanzen verwendet.
- 25 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.
- 30 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Li-*

num, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.

5

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

10

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

15

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

20

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

30

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der

35

Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von
5 dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren,
10 kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wild-
15 typ erhöht.
31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementation in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus
25 der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.
33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.
34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*,
30 *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
35
35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausgewählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Pri-

mulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.

- 5 36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.
- 10
- 15
- 20 37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.
- 25 38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
- 30 39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist.
- 35 40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist.
41. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID.

NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

- 5 42. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist.
- 10 43. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 39 bis 42, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 5 nicht enthalten ist.
- 15 44. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.
- 20 45. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.
- 25 46. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Sequenzprotokoll.txt
SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH & Co. KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

<130> 20020636

<160> 51

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

| | |
|---|---|
| <p><220> 1</p> <p>1 gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta</p> <p>2 Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu</p> <p>5</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>50</p> <p>55</p> <p>60</p> <p>65</p> <p>70</p> <p>75</p> <p>80</p> <p>gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat</p> <p>Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn</p> | <p>48</p> <p>96</p> <p>144</p> <p>192</p> <p>240</p> <p>288</p> |
|---|---|

Sequenzprotokoll.txt

| 85 | 90 | 95 | |
|--|-----|-----|---------|
| ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys | 100 | 105 | 110 336 |
| gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp | 115 | 120 | 125 384 |
| tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp | 130 | 135 | 140 432 |
| tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly | 145 | 150 | 155 480 |
| tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu | 165 | 170 | 175 528 |
| gat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val | 180 | 185 | 190 576 |
| caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly | 195 | 200 | 205 624 |
| ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe | 210 | 215 | 220 672 |
| tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His | 225 | 230 | 235 720 |
| gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile | 245 | 250 | 255 768 |
| tct tta taa Ser Leu | | | 777 |

10> 2
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<400> 2

Met val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Leu ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
 20 25 30
 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu

35

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
210 215 220

Pro Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
245 250 255

Ser Leu

<210> 3

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

Sequenzprotokoll.txt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 3

| | |
|---|-----|
| ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa | 48 |
| Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln | |
| 1 5 10 15 | |
| tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta | 96 |
| Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val | |
| 20 25 30 | |
| att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat | 144 |
| Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn | |
| 35 40 45 | |
| at gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa | 192 |
| Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln | |
| 50 55 60 | |
| atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat | 240 |
| Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His | |
| 65 70 75 80 | |
| ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca | 288 |
| Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser | |
| 85 90 95 | |
| cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag | 336 |
| Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys | |
| 100 105 110 | |
| aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat | 384 |
| Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp | |
| 115 120 125 | |
| ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc | 432 |
| Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe | |
| 130 135 140 | |
| atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta | 480 |
| Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu | |
| 145 150 155 160 | |
| ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc | 528 |
| Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile | |
| 165 170 175 | |
| tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat | 576 |
| Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr | |
| 180 185 190 | |
| ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat | 624 |
| Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr | |
| 195 200 205 | |
| ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc | 672 |
| Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile | |
| 210 215 220 | |

Sequenzprotokoll.txt

gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat 720
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240

gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac 768
 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
 245 250 255

aat tca gta acc aat tcg taa 789
 Asn Ser Val Thr Asn Ser
 260

<210> 4

<211> 262

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<100> 4

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

Ile Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
 130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
 145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
 165 170 175

Sequenzprotokoll.txt

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser
260

<210> 5

<211> 762

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

<223>

<200> 5

atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca
1 Ile Gln Leu 5 Glu Gln Pro Leu Ser His 10 Gln Ala Lys Leu Thr Pro 15 48

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc
Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe 20 Lys 25 Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val 30 96

att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac
Ile Val Ser 35 Ala Trp Val 40 Ile Ser Leu Ser Leu Leu 45 Ser Leu Asp 50 144

atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa
Ile Ser Lys Leu Lys Phe 55 Trp Met Leu Leu Pro 60 Val Ile Leu Trp Gln 65 192

aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat
Thr Phe Leu Tyr Thr 70 Gly Leu Phe Ile Thr 75 Ser His Asp Ala Met His 80 240

ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys 85 Ile Asn His Leu Ile Gly Thr 90 288

Sequenzprotokoll.txt

| 85 | | | | | | | | | | 90 | | | | | | | | | | 95 | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| ttg | acc | cta | tcc | ctt | tat | ggg | ctt | tta | cca | tat | caa | aaa | cta | ttg | aaa | 336 | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Thr | Leu | Ser | Leu | Tyr | Gly | Leu | Leu | Pro | Tyr | Gln | Lys | Leu | Leu | Lys | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| aaa | cat | tgg | tta | cac | cac | cac | aat | cca | gca | agc | tca | ata | gac | ccg | gat | 384 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | His | Trp | Leu | His | His | His | Asn | Pro | Ala | Ser | Ser | Ile | Asp | Pro | Asp | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ttt | cac | aat | ggg | aaa | cac | caa | agt | ttc | ttt | gct | tgg | tat | ttt | cat | ttt | 432 | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | His | Asn | Gly | Lys | His | Gln | Ser | Phe | Phe | Ala | Trp | Tyr | Phe | His | Phe | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| atg | aaa | ggg | tac | tgg | agt | tgg | ggg | caa | ata | att | gcg | ttg | act | att | att | 480 | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Lys | Gly | Tyr | Trp | Ser | Trp | Gly | Gln | Ile | Ile | Ala | Leu | Thr | Ile | Ile | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 145 | | | | 150 | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | | | | | | | | | | | |
| tat | aac | ttt | gct | aaa | tac | ata | ctc | cat | atc | cca | agt | gat | aat | cta | act | 528 | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Asn | Phe | Ala | Lys | Tyr | Ile | Leu | His | Ile | Pro | Ser | Asp | Asn | Leu | Thr | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| tac | ttt | tgg | gtg | cta | ccc | tcg | ctt | tta | agt | tca | tta | caa | tta | ttc | tat | 576 | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Phe | Trp | Val | Leu | Pro | Ser | Leu | Leu | Ser | Ser | Leu | Gln | Leu | Phe | Tyr | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ttt | ggg | act | ttt | tta | ccc | cat | agt | gaa | cca | ata | ggg | ggg | tat | ggt | cag | 624 | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Gly | Thr | Phe | Leu | Pro | His | Ser | Glu | Pro | Ile | Gly | Gly | Tyr | Val | Gln | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cct | cat | tgt | gcc | caa | aca | att | agc | cgt | cct | att | tgg | tgg | tca | ttt | atc | 672 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | His | Cys | Ala | Gln | Thr | Ile | Ser | Arg | Pro | Ile | Trp | Trp | Ser | Phe | Ile | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 210 | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| acg | tgc | tat | cat | ttt | ggc | tac | cac | gag | gaa | cat | cac | gaa | tat | cct | cat | 720 | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Cys | Tyr | His | Phe | Gly | Tyr | His | Glu | Glu | His | His | Glu | Tyr | Pro | His | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 225 | | | 230 | | | | 235 | | | | | 240 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| att | tct | tgg | tgg | cag | tta | cca | gaa | att | tac | aaa | gca | aaa | tag | | | 762 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | Ser | Trp | Trp | Gln | Leu | Pro | Glu | Ile | Tyr | Lys | Ala | Lys | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 6

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ile | Gln | Leu | Glu | Gln | Pro | Leu | Ser | His | Gln | Ala | Lys | Leu | Thr | Pro |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Leu | Arg | Ser | Lys | Ser | Gln | Phe | Lys | Gly | Leu | Phe | Ile | Ala | Ile | Val |
| | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Val | Ser | Ala | Trp | Val | Ile | Ser | Leu | Ser | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Asp |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Ser | Lys | Leu | Lys | Phe | Trp | Met | Leu | Leu | Pro | Val | Ile | Leu | Trp | Gln |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

Sequenzprotokoll.txt

50 55 60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
 85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
 100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
 115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
 130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
 165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
 195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
 210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
 245 250

<210> 7

<211> 789

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

Sequenzprotokoll.txt

```

<400> 7
atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48
Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96
Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
20 25 30

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144
Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
35 40 45

tat gcc aaa att cat aag tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192
Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
50 55 60

atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240
Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
65 70 75 80

ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288
Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
85 90 95

cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336
Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
100 105 110

aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat 384
Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
115 120 125

ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc 432
Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
130 135 140

atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta 480
Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
145 150 155 160

ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc 528
Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
165 170 175

tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat 576
Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat 624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc 672
Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat 720
Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac 768
Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

```


aat tca gta acc aat tcg taa
 Asn Ser Val Thr Asn Ser
 260

<210> 8

<211> 262

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 8

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45

Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
 130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
 145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
 165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
 195 200 205

Sequenzprotokoll.txt

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser
260

<210> 9

<211> 789

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 9

| | |
|---|----|
| atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa | 48 |
| Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln | |
| 1 5 10 15 | |

| | |
|---|----|
| tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta | 96 |
| Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val | |
| 20 25 30 | |

| | |
|--|-----|
| tt att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat | 144 |
| le ile ser leu trp val ala ser leu ala phe leu leu ala ile asn | |
| 35 40 45 | |

| | |
|---|-----|
| tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa | 192 |
| Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln | |
| 50 55 60 | |

| | |
|---|-----|
| atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat | 240 |
| Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His | |
| 65 70 75 80 | |

| | |
|---|-----|
| ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca | 288 |
| Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser | |
| 85 90 95 | |

| | |
|---|-----|
| cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag | 336 |
| Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys | |
| 100 105 110 | |

| | |
|---|-----|
| aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat | 384 |
| Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp | |

Sequenzprotokoll.txt

| 115 | 120 | 125 | | |
|---|-----|-----|--|-----|
| ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140 | | | | 432 |
| atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160 | | | | 480 |
| ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175 | | | | 528 |
| tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190 | | | | 576 |
| ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205 | | | | 624 |
| ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220 | | | | 672 |
| gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240 | | | | 720 |
| gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255 | | | | 768 |
| aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260 | | | | 789 |

<210> 10

<211> 262

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 10

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
Seite 12

Sequenzprotokoll.txt

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp
115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Val Pro Trp Trp **Gln** Leu Pro Ser Val **Tyr** Lys Gln Arg Val **Phe** Asn
245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser
260

<210> 11

<211> 762

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (762)

<223>

Sequenzprotokoll.txt

```

<400> 11
atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48
Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
1 5 10 15

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96
Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
20 25 30

att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144
Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
35 40 45

atc tca aag att cat aag tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192
Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
50 55 60

aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240
Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80

ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
85 90 95

ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336
Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Lys
100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384
Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
115 120 125

ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432
Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140

atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480
Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act 528
Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat 576
Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag 624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc 672
Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat 720
Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag 762
Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

```

Sequenzprotokoll.txt

<210> 12

<211> 253

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 12

Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
1 5 10 15

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
20 25 30

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
35 40 45

Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
50 55 60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

Sequenzprotokoll.txt

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

<210> 13

<211> 762

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

<223>

<400> 13

atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48
Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
1 5 10 15

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96
Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
20 25 30

att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144
Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
35 40 45

atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192
Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
50 55 60

ca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240
Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80

ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
85 90 95

ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336
Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc gat tta gac ccg gat 384
Lys His Trp Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp
115 120 125

ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432
Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140

atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480
Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile

Sequenzprotokoll.txt

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 | |
| tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act | | | | 528 |
| Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr | | | | |
| | 165 | 170 | 175 | |
| tac ttt tgg gtg cta ccc tgc ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat | | | | 576 |
| Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr | | | | |
| | 180 | 185 | 190 | |
| ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag | | | | 624 |
| Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln | | | | |
| | 195 | 200 | 205 | |
| cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc | | | | 672 |
| Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile | | | | |
| | 210 | 215 | 220 | |
| acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat | | | | 720 |
| Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His | | | | |
| | 225 | 230 | 235 | |
| att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag | | | | 762 |
| Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys | | | | |
| | 245 | 250 | | |

<210> 14

<211> 253

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<400> 14

| |
|---|
| Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro |
| 1 5 10 15 |

| |
|---|
| Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val |
| 20 25 30 |

| |
|---|
| Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp |
| 35 40 45 |

| |
|---|
| Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln |
| 50 55 60 |

| |
|---|
| Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His |
| 65 70 75 80 |

| |
|---|
| Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr |
| 85 90 95 |

| |
|---|
| Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys |
| 100 105 110 |

| |
|---|
| Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp |
|---|

115

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

<210> 15

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(971)

<223>

<400> 15

ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47
Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile
1 5 10 15

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95
Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu
20 25 30

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143
Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala
35 40 45

Sequenzprotokoll.txt

| | |
|---|-----|
| cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser 50 55 60 | 191 |
| tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag cgg ctg gga Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly 65 70 75 | 239 |
| acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala 80 85 90 95 | 287 |
| ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys 100 105 110 | 335 |
| cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly 115 120 125 | 383 |
| gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His 130 135 140 | 431 |
| atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu 145 150 155 | 479 |
| ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr 160 165 170 175 | 527 |
| gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His 180 185 190 | 575 |
| aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu 195 200 205 | 623 |
| ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly 210 215 220 | 671 |
| ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu 225 230 235 | 719 |
| ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu 240 245 250 255 | 767 |
| gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met 260 265 270 | 815 |
| aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly 275 280 285 | 863 |
| ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile 290 295 300 | 911 |
| cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp 305 310 315 | 959 |

Sequenzprotokoll.txt

tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct gggttcacac ctcatgcctg 1011
 Ser Lys Arg
 320

tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggtctga 1071
 tggccaatgg catcggccat gtctggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggatgatg 1131
 cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc 1191
 caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggg tgtgaagcaa tgactccgcc 1251
 catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta 1311
 gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg ttgtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg 1371
 catgatgtac tcgtcatggg gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431
 agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491
 ggctcgtgcc agaaatggg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551
 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

<210> 16

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 16

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
 20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
 35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
 50 55 60

Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
 85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
 100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
 115 120 125

Sequenzprotokoll.txt

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
130 135 140

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
145 150 155 160

Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
165 170 175

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
225 230 235 240

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
245 250 255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
305 310 315 320

Lys Arg

<210> 17

<211> 1650

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<220>

<221> CDS

<222> (112)..(1614)

Sequenzprotokoll.txt

<223>

```

<400> 17
ggcacgagga aacttttctc tcttcactag ctgtttacat gcttgaaatt tcaagatttt 60
aggaccccat ttgaagtttt cttgaaacaa atattaccct gttggaaaaa g atg gat 117
                                     Met Asp
                                     1

act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat 165
Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His
5 10 15

ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat 213
Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn
20 25 30

ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt 261
Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val Cys Val
35 40 45 50

aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc aaa aag 309
Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Val Pro Glu Thr Lys Lys
55 60 65

gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa ggt gtt 357
Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Val
70 75 80

ggt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt gct gtt 405
Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val
85 90 95

gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att gat ccg 453
Ala Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp Pro
100 105 110

aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg gat gaa 501
Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu
115 120 125 130

ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg tct ggt 549
Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp Ser Gly
135 140 145

gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat aga cct 597
Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His Arg Pro
150 155 160

tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg cag aaa 645
Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met Gln Lys
165 170 175

tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata aag gtg 693
Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile Lys Val
180 185 190

att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt att act 741
Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly Ile Thr
195 200 205 210

att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga tct ctt 789
Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Ser Leu
215 220 225

```

Sequenzprotokoll.txt

| | |
|--|------|
| gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct tat ggc Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr Gly | 837 |
| att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag atg gtt Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His 235 Pro Phe Asp Val Asn Lys Met Val | 885 |
| ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat ctc aag Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp Leu Lys | 933 |
| gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca ttt tca Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Ser | 981 |
| tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt cct ggc Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro Gly | 1029 |
| ttg cgt ata gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta aac cat Leu Arg Ile Asp Ile Gln Glu Arg 310 Met Val Ala Arg Leu Asn His | 1077 |
| ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt cta ata Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Leu Ile | 1125 |
| cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt gga atc Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile | 1173 |
| ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg gtg gca Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr 365 Gly Tyr Met Val Ala | 1221 |
| agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att caa tac Arg Thr Leu Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile Gln Tyr | 1269 |
| ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca gct gtt Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val | 1317 |
| ttg aaa gat ttg ttg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag ttc ttc Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe | 1365 |
| tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct aca aga Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg | 1413 |
| agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg cat ggc Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly | 1461 |
| ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt ggg ctg Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe Gly Leu | 1509 |
| tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata atg aca Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr 475 Ser Arg Phe Glu Ile Met Thr | 1557 |
| aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta cag gat Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu Gln Asp | 1605 |

Sequenzprotokoll.txt

1650

aaa gaa tga atccgagtaa ttcggaatct tgtccaatct cgtgcc
 Lys Glu
 500

<210> 18

<211> 500

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 18

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
 1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
 20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
 35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
 50 55 60

Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
 65 70 75 80

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
 85 90 95

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
 100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
 115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
 130 135 140

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
 145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
 165 170 175

Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
 180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
 195 200 205

Sequenzprotokoll.txt

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
 210 215 220

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
 225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
 245 250 255

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
 260 265 270

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
 275 280 285

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
 290 295 300

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
 305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
 325 330 335

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
 340 345 350

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
 355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
 370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
 385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
 405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
 420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
 435 440 445

His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
 450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
 465 470 475 480

Sequenzprotokoll.txt

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
485 490 495

Gln Asp Lys Glu
500

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 19
gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 20
gcatgcatct agaaatgggt cagtgcaac cat

33

<210> 21

<211> 805

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

Sequenzprotokoll.txt

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 21

```
gcatgcatct agaaatggtt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactggtgt      60
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatattt attgcctgct      120
ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa      180
ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat      240
ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata      300
attttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga      360
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg      420
gtcatcccca aaacttcttt ctttggatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga      480
cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctggtg catataccag      540
aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt      600
attttggtac atttttgcct cataaaaagc tagaagggtg ttatactaac cccattgtg      660
cgcgcagtat cccattacct cttttttggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc      720
acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gctcacaaaa      780
tatctttata aggtctagag catgc                                           805
```

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 22

```
aggtaccgca cggctcgcca atcc                                           24
```

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

Sequenzprotokoll.txt

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 23
aagcttgacc tgattatcag cacggt

26

<210> 24

<211> 4624

<212> DNA

<213> Erwinia uredovora

<220>

<221> CDS

<222> (128)..(1267)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1288)..(2766)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (2802)..(3689)

<223>

<220>

<221> iDNA

<222> (3631)..(4158)

<223>

Sequenzprotokoll.txt

```

<400> 24
gtcgactttc agcagcgcac ggcgaaaatc cagacagccc ttcgtttggc agggggcacc      60
atggccgctg ccgatatcat tgagcaggtt atgtgcaccg gtcagcctgt cttaagtggg      120
agcgggct atg caa ccg cat tat gat ctg att ctc gtg ggg gct gga ctc      169
      Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu
      1          5          10
gcg aat ggc ctt atc gcc ctg cgt ctt cag cag cag caa cct gat atg      217
Ala Asn Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Pro Asp Met
15          20          25          30
cgt att ttg ctt atc gac gcc gca ccc cag gcg ggc ggg aat cat acg      265
Arg Ile Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr
          35          40          45
tgg tca ttt cac cac gat gat ttg act gag agc caa cat cgt tgg ata      313
Trp Ser Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile
          50          55          60
gct ccg ctg gtg gtt cat cac tgg ccc gac tat cag gta cgc ttt ccc      361
Ala Pro Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro
          65          70          75
aca cgc cgt cgt aag ctg aac agc ggc tac ttt tgt att act tct cag      409
Thr Arg Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln
          80          85          90
cgt ttc gct gag gtt tta cag cga cag ttt ggc ccg cac ttg tgg atg      457
Arg Phe Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met
          95          100          105          110
gat acc gcg gtc gca gag gtt aat gcg gaa tct gtt cgg ttg aaa aag      505
Asp Thr Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys
          115          120          125
ggt cag gtt atc ggt gcc cgc gcg gtg att gac ggg cgg ggt tat gcg      553
Gly Gln Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala
          130          135          140
gca aat tca gca ctg agc gtg ggc ttc cag gcg ttt att ggc cag gaa      601
Ala Asn Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu
          145          150          155
g cga ttg agc cac ccg cat ggt tta tcg tct ccc att atc atg gat      649
p Arg Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp
          160          165          170
gcc acg gtc gat cag caa aat ggt tat cgc ttc gtg tac agc ctg ccg      697
Ala Thr Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro
          175          180          185          190
ctc tcg ccg acc aga ttg tta att gaa gac acg cac tat att gat aat      745
Leu Ser Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn
          195          200          205
gcg aca tta gat cct gaa tgc gcg cgg caa aat att tgc gac tat gcc      793
Ala Thr Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg 215 Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala
          210          215          220
gcg caa cag ggt tgg cag ctt cag aca ctg ctg cga gaa gaa cag gcc      841
Ala Gln Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly
          225          230          235
gcc tta ccc att act ctg tcg ggc aat gcc gac gca ttc tgg cag cag      889
Ala Leu Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln

```

Sequenzprotokoll.txt

| | | | | |
|-------------------|------------|------------|------------|-------------------|
| 240 | | 245 | 250 | |
| cgc Arg 255 | ccc Pro | ctg Leu | gcc Ala | tgt Cys 260 |
| | | | | agt Ser 260 |
| | | | | gga Gly |
| | | | | tta Leu |
| | | | | cgt Arg |
| | | | | gcc Ala 265 |
| | | | | ggt Gly |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | ttc Phe |
| | | | | cat His |
| | | | | cct Pro |
| | | | | acc Thr 270 |
| | | | | 937 |
| | | | | |
| | | | | acc Thr |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | tca Ser |
| | | | | ctg Leu 275 |
| | | | | ccg Pro |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | gcg Ala |
| | | | | gtt Val |
| | | | | gcc Ala 280 |
| | | | | gtg Val |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | gac Asp |
| | | | | cgc Arg |
| | | | | ctg Leu 285 |
| | | | | 985 |
| | | | | |
| | | | | gca Ala |
| | | | | ctt Leu |
| | | | | gat Asp |
| | | | | gtc Val 290 |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | acg Thr |
| | | | | tcg Ser |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | tca Ser 295 |
| | | | | att Ile |
| | | | | cac His |
| | | | | cat His |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | att Ile 300 |
| | | | | acg Thr |
| | | | | cat His |
| | | | | 1033 |
| | | | | |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | cgc Arg 305 |
| | | | | gag Glu |
| | | | | cgc Arg |
| | | | | tgg Trp |
| | | | | cag Gln |
| | | | | cag Gln 310 |
| | | | | cag Gln |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | ttc Phe |
| | | | | cgc Arg 315 |
| | | | | atg Met |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | aat Asn |
| | | | | 1081 |
| | | | | |
| | | | | cgc Arg |
| | | | | atg Met 320 |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | tta Leu |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | gga Gly 325 |
| | | | | ccc Pro |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | gat Asp |
| | | | | tca Ser |
| | | | | cgc Arg 330 |
| | | | | tgg Trp |
| | | | | cgg Arg |
| | | | | gtt Val |
| | | | | atg Met |
| | | | | 1129 |
| | | | | |
| | | | | cag Gln 335 |
| | | | | cgt Arg |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | gct Ala 350 |
| | | | | 1177 |
| | | | | |
| | | | | gga Gly |
| | | | | aaa Lys |
| | | | | ctc Leu |
| | | | | acg Thr 355 |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | acc Thr |
| | | | | gat Asp |
| | | | | cgg Arg |
| | | | | cta Leu |
| | | | | cgt Ile 360 |
| | | | | att Ile |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | agc Ser |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | aag Lys 365 |
| | | | | ccg Pro |
| | | | | 1225 |
| | | | | |
| | | | | cct Pro |
| | | | | gtt Val |
| | | | | ccg Pro |
| | | | | gta Val 370 |
| | | | | tta Leu |
| | | | | gca Ala |
| | | | | gca Ala |
| | | | | ttg Leu |
| | | | | caa Gln 375 |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | att Ile |
| | | | | atg Met |
| | | | | acg Thr 380 |
| | | | | 1267 |
| | | | | |
| | | | | catcgttaaa |
| | | | | gagcgcactac |
| | | | | atg |
| | | | | Met |
| | | | | Lys |
| | | | | Pro |
| | | | | Thr |
| | | | | Val |
| | | | | Ile |
| | | | | Gly |
| | | | | Ala |
| | | | | Gly |
| | | | | Phe |
| | | | | 390 |
| | | | | 1320 |
| | | | | |
| | | | | ggt Gly |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | gca Ala 395 |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | gca Ala |
| | | | | att Ile |
| | | | | cgt Arg |
| | | | | cta Leu 400 |
| | | | | caa Gln |
| | | | | gct Ala |
| | | | | gcg Ala |
| | | | | ggg Gly 405 |
| | | | | atc Ile |
| | | | | ccc Pro |
| | | | | gtc Val |
| | | | | 1368 |
| | | | | |
| | | | | tta Leu |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | ctt Leu 410 |
| | | | | gaa Glu |
| | | | | caa Gln |
| | | | | cgt Arg |
| | | | | gat Asp |
| | | | | aaa Lys 415 |
| | | | | ccc Pro |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | ggt Gly |
| | | | | cgg Arg |
| | | | | gct Ala 420 |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | gtc Val |
| | | | | tac Tyr |
| | | | | 1416 |
| | | | | |
| | | | | g Glu |
| | | | | gat Asp 425 |
| | | | | cag Gln |
| | | | | ggg Gly |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | acc Thr |
| | | | | ttt Phe 430 |
| | | | | gat Asp |
| | | | | gca Ala |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | ccg Pro |
| | | | | acg Thr 435 |
| | | | | gtt Val |
| | | | | atc Ile |
| | | | | acc Thr |
| | | | | gat Asp |
| | | | | 1464 |
| | | | | |
| | | | | ccc Pro 440 |
| | | | | agt Ser |
| | | | | gcc Ala |
| | | | | att Ile |
| | | | | gaa Glu |
| | | | | gaa Glu 445 |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | gca Ala |
| | | | | ctg Leu 450 |
| | | | | gga Gly |
| | | | | aaa Lys |
| | | | | cag Gln |
| | | | | tta Leu |
| | | | | aaa Lys 455 |
| | | | | 1512 |
| | | | | |
| | | | | gag Glu |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | gtc Val |
| | | | | gaa Glu 460 |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | ccg Pro |
| | | | | gtt Val |
| | | | | acg Thr 465 |
| | | | | ccg Pro |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | tac Tyr |
| | | | | cgc Arg |
| | | | | ctg Leu 470 |
| | | | | tgt Cys |
| | | | | tgg Trp |
| | | | | 1560 |
| | | | | |
| | | | | gag Glu |
| | | | | tca Ser |
| | | | | ggg Gly |
| | | | | aag Lys 475 |
| | | | | gtc Val |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | aat Asn |
| | | | | tac Tyr |
| | | | | gat Asp 480 |
| | | | | aac Asn |
| | | | | gat Asp |
| | | | | caa Gln |
| | | | | acc Thr |
| | | | | cgg Arg 485 |
| | | | | ctc Leu |
| | | | | gaa Glu |
| | | | | 1608 |
| | | | | |
| | | | | gcg Ala |
| | | | | cag Gln |
| | | | | att Ile 490 |
| | | | | cag Gln |
| | | | | cag Gln |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | aat Asn |
| | | | | ccc Pro 495 |
| | | | | cgc Arg |
| | | | | gat Asp |
| | | | | gtc Val |
| | | | | gaa Glu |
| | | | | ggt Gly 500 |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | cgt Arg |
| | | | | cag Gln |
| | | | | 1656 |
| | | | | |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | ctg Leu |
| | | | | gac Asp |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | tca Ser |
| | | | | cgc Arg |
| | | | | gcg Ala |
| | | | | gtg Val |
| | | | | ttt Phe |
| | | | | aaa Lys |
| | | | | gaa Glu |
| | | | | ggc Gly |
| | | | | tat Tyr |
| | | | | cta Leu |
| | | | | aag Lys |
| | | | | ctc Leu |
| | | | | 1704 |

Sequenzprotokoll.txt
515

| 505 | 510 | 515 | |
|---|-----|-----|------|
| ggt act gtc cct ttt tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct Gly Thr Val Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro 520 525 530 | | | 1752 |
| caa ctg gcg aaa ctg cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc Gln Leu Ala Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala 540 545 550 | | | 1800 |
| agt tac atc gaa gat gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg Ser Tyr Ile Gln Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser 555 560 565 | | | 1848 |
| ctg ttg gtg ggc ggc aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg Leu Leu Val Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu 570 575 580 | | | 1896 |
| ata cac gcg ctg gag cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc gcc Ile His Ala Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly 585 590 595 | | | 1944 |
| acc ggc gca tta gtt cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt r Gly Ala Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly 600 605 610 | | | 1992 |
| ggc gaa gtc gtg tta aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga Gly Glu Val Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly 620 625 630 | | | 2040 |
| aac aag att gaa gcc gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg Asn Lys Ile Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr 635 640 645 | | | 2088 |
| caa gcc gtc gcg tca aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg Gln Ala Val Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu 650 655 660 | | | 2136 |
| tta agc cag cac cct gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr 665 670 675 | | | 2184 |
| aag cgc atg agt aac tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac Lys Arg Met Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His 680 685 690 695 | | | 2232 |
| t cat gat cag ctc gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac s His Asp Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr 700 705 710 | | | 2280 |
| cgc gag ctg att gac gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac Arg Glu Leu Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp 715 720 725 | | | 2328 |
| ttc tca ctt tat ctg cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg Phe Ser Leu Tyr Leu His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala 730 735 740 | | | 2376 |
| cct gaa ggt tgc ggc agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta Pro Glu Gly Cys Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu 745 750 755 | | | 2424 |
| ggc acc gcg aac ctc gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac Gly Thr Ala Asn Leu Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp 760 765 770 775 | | | 2472 |
| cgt att ttt gcg tac ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cgg agt Arg Ile Phe Ala Tyr Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser | | | 2520 |

Sequenzprotokoll.txt

| 780 | 785 | 790 | |
|---|-----|-----|------|
| cag ctg gtc acg cac cgg atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag Gln Leu Val Thr His Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln 795 800 805 | | | 2568 |
| ctt aat gcc tat cat ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc Leu Asn Ala Tyr His Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr 810 815 820 | | | 2616 |
| cag agc gcc tgg ttt cgg ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat Gln Ser Ala Trp Phe Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn 825 830 835 | | | 2664 |
| ctc tac ctg gtc ggc gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc Leu Tyr Leu Val Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly 840 845 850 855 | | | 2712 |
| gtc atc ggc tcg gca aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg Val Ile Gly Ser Ala Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu 860 865 870 | | | 2760 |
| att tga ataatccgtc gttactcaat catgcggtcg aaacg atg gca gtt ggc le Met Ala Val Gly 875 | | | 2813 |
| tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc cgg Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr Arg 880 885 890 | | | 2861 |
| cgc agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat gtt Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp Val 895 900 905 | | | 2909 |
| att gac gat cag acg ctg ggc ttt cag gcc cgc cag cct gcc tta caa Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu Gln 910 915 920 | | | 2957 |
| acg ccc gaa caa cgt ctg atg caa ctt gag atg aaa acg cgc cag gcc Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln Ala 925 930 935 940 | | | 3005 |
| tat gca gga tcg cag atg cac gaa ccg gcg ttt gcg gct ttt cag gaa Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln Glu 945 950 955 | | | 3053 |
| g gct atg gct cat gat atc gcc ccg gct tac gcg ttt gat cat ctg Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His Leu 960 965 970 | | | 3101 |
| gaa ggc ttc gcc atg gat gta cgc gaa gcg caa tac agc caa ctg gat Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu Asp 975 980 985 | | | 3149 |
| gat acg ctg cgc tat tgc tat cac gtt gca ggc gtt gtc ggc ttg atg Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu Met 990 995 1000 | | | 3197 |
| atg gcg caa atc atg ggc gtg cgg gat aac gcc acg ctg gac cgc Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg 1005 1010 1015 | | | 3242 |
| gcc tgt gac ctt ggg ctg gca ttt cag ttg acc aat att gct cgc Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg 1020 1025 1030 | | | 3287 |
| gat att gtg gac gat gcg cat gcg ggc cgc tgt tat ctg ccg gca Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala 1035 1040 1045 | | | 3332 |

Sequenzprotokoll.txt

| | | | | |
|--|--|------|------|------|
| 1035 | | 1040 | 1045 | |
| agc tgg ctg gag cat gaa ggt ctg aac aaa gag aat tat gcg gca | | | | 3377 |
| Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala | | | | |
| 1050 | | 1055 | 1060 | |
| cct gaa aac cgt cag gcg ctg agc cgt atc gcc cgt cgt ttg gtg | | | | 3422 |
| Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val | | | | |
| 1065 | | 1070 | 1075 | |
| cag gaa gca gaa cct tac tat ttg tct gcc aca gcc gcc ctg gca | | | | 3467 |
| Gln Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala | | | | |
| 1080 | | 1085 | 1090 | |
| ggg ttg ccc ctg cgt tcc gcc tgg gca atc gct acg gcg aag cag | | | | 3512 |
| Gly Leu Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln | | | | |
| 1095 | | 1100 | 1105 | |
| gtt tac cgg aaa ata ggt gtc aaa gtt gaa cag gcc ggt cag caa | | | | 3557 |
| Val Tyr Arg Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln | | | | |
| 1110 | | 1115 | 1120 | |
| gcc tgg gat cag cgg cag tca acg acc acg ccc gaa aaa tta acg | | | | 3602 |
| Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr | | | | |
| 1125 | | 1130 | 1135 | |
| ctg ctg ctg gcc gcc tct ggt cag gcc ctt act tcc cgg atg cgg | | | | 3647 |
| Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg | | | | |
| 1140 | | 1145 | 1150 | |
| gct cat cct ccc cgc cct gcg cat ctc tgg cag cgc ccg ctc | | | | 3689 |
| Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu | | | | |
| 1155 | | 1160 | 1165 | |
| tagcgccatg tctttcccg agcgtcgcct gaagttttga caggggcggc gcatagagga | | | | 3749 |
| agccaaaaga aacacaacct tctttgcccc tgacggcgtg atgcatacgg tgcgccatat | | | | 3809 |
| acaaccgttt gaggtagccc ttgcgtggaa tatagcggaa tggccaacgt tgatgcacca | | | | 3869 |
| gcccgtcgtg caccataaaa tagagtaatc catacgccgt catacctgcg ccaatccact | | | | 3929 |
| ggagcggcca cattcctgta ctgcccagat aaatcagcag gatcgataat gcagcaaaaa | | | | 3989 |
| ccacggcata aagatcgtaa acttcaaacg cacctttacg cggttcatga tgtgaaagat | | | | 4049 |
| catcccca accccagccg tgcgatgatgt atttgtgtgc cagtgcagca atcacttcca | | | | 4109 |
| cgccaatcac ggtaacgaaa acgatcaggg cattccaaat ccacaacata atttctccgg | | | | 4169 |
| tagagacgtc tggcagcagg cttaaggatt caattttaac agagattagc cgatctggcg | | | | 4229 |
| gcgggaaggg aaaaaggcgc gccagaaagg cgcgccaggg atcagaagtc ggctttcaga | | | | 4289 |
| accacacggt agttggcttt acctgcacga acatgggtcca gtgcatcggt gattttcgac | | | | 4349 |
| atcggaagt actccactgt cggcgcaata tctgtacggc cagccagctt cagcagtga | | | | 4409 |
| cgcagctgcg caggtgaacc ggttgaagaa cccgtcacgg cgcggtcgcc taaaatcagg | | | | 4469 |
| ctgaaagccg ggcacgtcaa acggcttcag tacggcacc acggtatgga acttaccgcg | | | | 4529 |
| aggcgccagg gccgcaaagt agggttgcc gtcgagatcg acggcgaccg tgctgataat | | | | 4589 |
| caggtcaaac tggcccgcga ggctttttaa agctt | | | | 4624 |

<210> 25

Sequenzprotokoll.txt

<211> 380

<212> PRT

<213> Erwinia uredovora

<400> 25

Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn
1 5 10 15

Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile
20 25 30

Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser
35 40 45

His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile Ala Pro
50 55 60

Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg
65 70 75 80

Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln Arg Phe
85 90 95

Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr
100 105 110

Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln
115 120 125

Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn
130 135 140

Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg
145 150 155 160

Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr
165 170 175

Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser
180 185 190

Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr
195 200 205

Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln
210 215 220

Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu
Seite 34

Sequenzprotokoll.txt

225

230

235

240

Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro
 245 250 255

Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly
 260 265 270

Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu
 275 280 285

Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala
 290 295 300

Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met
 305 310 315 320

Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg
 325 330 335

Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys
 340 345 350

Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val
 355 360 365

Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr
 370 375 380

<210> 26

<211> 492

<212> PRT

<213> Erwinia uredovora

<400> 26

Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln
 20 25 30

Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe
 35 40 45

Thr phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu
 50 55 60

Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu
 65 70 75 80 85 90 95
 35

Sequenzprotokoll.txt

65

70

75

80

Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val
85 90 95

Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser
115 120 125

Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe
130 135 140

Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu
145 150 155 160

Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp
165 170 175

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly
180 185 190

Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu
195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val
210 215 220

Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu
225 230 235 240

Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala
245 250 255

His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser
260 265 270

Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro
275 280 285

Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn
290 295 300

Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu
305 310 315 320

Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp
325 330 335

Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu
Seite 36

Sequenzprotokoll.txt

340

345

350

His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly
 355 360 365

Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu
 370 375 380

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr
 385 390 395 400

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His
 405 410 415

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His
 420 425 430

Y Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe
 435 440 445

Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly
 450 455 460

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala
 465 470 475 480

Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile
 485 490

<210> 27

<211> 296

<212> PRT

<213> Erwinia uredovora

<400> 27

Met Ala Val Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp
 1 5 10 15

Ala Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His
 20 25 30

Cys Asp Asp Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln
 35 40 45

Pro Ala Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys
 50 55 60

Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala
 Seite 37

Sequenzprotokoll.txt

65

70

75

80

Ala Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala
 85 90 95

Phe Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr
 100 105 110

Ser Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val
 115 120 125

Val Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr
 130 135 140

Leu Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile
 145 150 155 160

Ala Arg Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro
 165 170 175

Ala Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala
 180 185 190

Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln
 195 200 205

Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu
 210 215 220

Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg
 225 230 235 240

Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln
 245 250 255

Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala
 260 265 270

Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro
 275 280 285

Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu
 290 295

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

Sequenzprotokoll.txt

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 28

tttttctcga gcgataaacg ctccacttggt ta

32

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 29

tttttgcga cacgttatgc tcacaacccc gg

32

<210> 30

<211> 679

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (87)..(635)

<223>

<400> 30

ctcgagcgat aaacgctcac ttgggttaatc atttcactct tcaattatct ataattgatga

60

gtgatcagaa ttacatgtga gaaatt atg caa acg gaa cac gtc att tta ttg
Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu
1 5

113

aat gca cag gga gtt ccc acg ggt acg ctg gaa aag tat gcc gca cac
Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His

161

Sequenzprotokoll.txt

```

10                               15                               20                               25
acg gca gac acc cgc tta cat ctc gcg ttc tcc agt tgg ctg ttt aat      209
Thr Ala Asp Thr Arg Leu His Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn
30                               35                               40

gcc aaa gga caa tta tta gtt acc cgc cgc gca ctg agc aaa aaa gca      257
Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala
45                               50                               55

tgg cct ggc gtg tgg act aac tcg gtt tgt ggg cac cca caa ctg gga      305
Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly
60                               65                               70

gaa agc aac gaa gac gca gtg atc cgc cgt tgc cgt tat gag ctt ggc      353
Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly
75                               80                               85

gtg gaa att acg cct cct gaa tct atc tat cct gac ttt cgc tac cgc      401
Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg
90                               95                               100                               105

gcc acc gat ccg agt ggc att gtg gaa aat gaa gtg tgt ccg gta ttt      449
Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe
110                               115                               120

gcc gca cgc acc act agt gcg tta cag atc aat gat gat gaa gtg atg      497
Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met
125                               130                               135

gat tat caa tgg tgt gat tta gca gat gta tta cac ggt att gat gcc      545
Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala
140                               145                               150

acg ccg tgg gcg ttc agt ccg tgg atg gtg atg cag gcg aca aat cgc      593
Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg
155                               160                               165

gaa gcc aga aaa cga tta tct gca ttt acc cag ctt aaa taa      635
Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser Ala Phe Thr Gln Leu Lys
170                               175                               180

aaaaaccccg acatttgcg gggttgtgag cataacgtgt cgac      679

```

<210> 31

<211> 182

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 31

```

Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr
1      5      10      15

```

```

Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His
20      25      30

```

```

Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val
35      40      45

```

Sequenzprotokoll.txt

Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn
50 55 60

Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val
65 70 75 80

Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu
85 90 95

Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile
100 105 110

Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala
115 120 125

Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu
130 135 140

Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro
145 150 155 160

Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser
165 170 175

Ala Phe Thr Gln Leu Lys
180

<210> 32
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)
<223>

<400> 32
ttttccatg gtgaaggagg aaatagcgaa a

31

<210> 33
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

Sequenzprotokoll.txt

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 33
ttttaagct ttcacttttt tcttgtaacc aa

32

<210> 34

<211> 962

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(956)

<223>

<400> 34
cc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg gcc gaa ata atc aac aaa 47
Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag ccg att gga ctc tac aaa 95
Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys
20 25 30

c gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc aag agg cta agg cct gta 143
a Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val
35 40 45

ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg aaa gac tac aga aag att 191
Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile
50 55 60

atc ccg gct gct gtc agc att gaa aca atc cac aac ttc acc ctc gtg 239
Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val
65 70 75

cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg agg agg gga gtt ccg acg 287
His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr
80 85 90 95

gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc att tta gca ggc gac aca 335
Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr
100 105 110

ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca aag tgc gat gtt gag agc 383
Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser

Sequenzprotokoll.txt

| 115 | 120 | 125 | |
|---|-----|-----|-----|
| gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt tcg gac gtt tgc ata aaa Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys 130 135 140 | | | 431 |
| ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc ttt gag aaa aag gag agc Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser 145 150 155 | | | 479 |
| gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc gag ctg aag acc gga gtg Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val 160 165 170 175 | | | 527 |
| ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg gtg ctt ttt ggg gag agc Leu Ile Ala Ala Ser 180 Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser 190 | | | 575 |
| gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac gga gtt ctt agc ggt att Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile 195 200 205 | | | 623 |
| ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac ctg act gag gag acc gga y Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly 210 215 220 | | | 671 |
| aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg aag aaa acc ctg att gtc Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Lys Gly Lys Thr 235 | | | 719 |
| ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta aag acg ttt gga aag gaa Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu 240 245 250 255 | | | 767 |
| aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat atc gaa aag tta aga gag Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu 260 265 270 | | | 815 |
| tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg gca aga aag atg gct gaa Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu 275 280 285 | | | 863 |
| gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct gaa agc aaa gcc aag gaa Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val 295 Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu 290 300 | | | 911 |
| a ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt aca aga aaa aag tga r Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys 305 310 315 | | | 956 |
| aagctt | | | 962 |
| <210> 35 | | | |
| <211> 317 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Archaeoglobus fulgidus | | | |
| <400> 35 | | | |
| Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala 1 5 10 15 | | | |

Sequenzprotokoll.txt

Ile Glu Glu Leu₂₀ Leu Pro Glu Arg Glu₂₅ Pro Ile Gly Leu Tyr₃₀ Lys Ala
Ala Arg His₃₅ Leu Ile Lys Ala Gly₄₀ Gly Lys Arg Leu Arg₄₅ Pro Val Ile
Ser Leu₅₀ Leu Ala Val Glu Ala₅₅ Leu Gly Lys Asp Tyr₆₀ Arg Lys Ile Ile
Pro Ala Ala Val Ser Ile₇₀ Glu Thr Ile His Asn₇₅ Phe Thr Leu Val His₈₀
Asp Asp Ile Met Asp₈₅ Arg Asp Glu Met Arg₉₀ Arg Gly Val Pro Thr Val₉₅
His Arg Val Tyr₁₀₀ Gly Glu Ala Thr Ala₁₀₅ Ile Leu Ala Gly Asp₁₁₀ Thr Leu
Phe Ala Glu₁₁₅ Ala Phe Lys Leu Leu₁₂₀ Thr Lys Cys Asp Val₁₂₅ Glu Ser Glu
Gly Ile₁₃₀ Arg Lys Ala Thr Glu₁₃₅ Met Leu Ser Asp Val₁₄₀ Cys Ile Lys Ile
Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr₁₅₀ Asp Met Ser Phe Glu₁₅₅ Lys Lys Glu Ser Val₁₆₀
Ser Glu Glu Glu Tyr₁₆₅ Leu Arg Met Val Glu₁₇₀ Leu Lys Thr Gly Val₁₇₅ Leu
Ile Ala Ala Ser₁₈₀ Ala Ala Leu Pro Ala₁₈₅ Val Leu Phe Gly Glu₁₉₀ Ser Glu
Glu Ile Val₁₉₅ Lys Ala Leu Trp Asp₂₀₀ Tyr Gly Val Leu Ser₂₀₅ Gly Ile Gly
Phe Gln Ile Gln Asp Asp₂₁₅ Leu Leu Asp Leu Thr Glu₂₂₀ Glu Thr Gly Lys
Asp Trp Gly Ser Asp Leu₂₃₀ Leu Lys Gly Lys Lys₂₃₅ Thr Leu Ile Val Ile₂₄₀
Lys Ala Phe Glu Lys₂₄₅ Gly Val Lys Leu Lys₂₅₀ Thr Phe Gly Lys Glu₂₅₅ Lys
Ala Asp Val Ser₂₆₀ Glu Ile Arg Asp Asp₂₆₅ Ile Glu Lys Leu Arg₂₇₀ Glu Cys
Gly Ala Ile₂₇₅ Asp Tyr Ala Ala Ser₂₈₀ Met Ala Arg Lys Met₂₈₅ Ala Glu Glu

Sequenzprotokoll.txt

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr
290 295 300

Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys
305 310 315

<210> 36

<211> 1293

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<220>

<221> CDS

<222> (206)..(1159)

<223>

<400> 36

taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 60

gccccccctc gacgccgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcgtggg attgacgtga 120

gggggcaggg atggctatat ttctgggagc gaactccggg cgaggatcta gttgtaggga 180

gggattcatg acaccacaaa cagcc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg 232
Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg
1 5

gcc gaa ata atc aac aaa gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag 280
Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu
10 15 20 25

ccg att gga ctc tac aaa gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc 328
Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly
30 35 40

aag agg cta agg cct gta ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg 376
Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly
45 50 55

aaa gac tac aga aag att atc ccg gct gct gtc agc att gaa aca atc 424
Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile
60 65 70

cac aac ttc acc ctc gtg cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg 472
His Asn Phe Thr Leu Val His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met
75 80 85

agg agg gga gtt ccg acg gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc 520
Arg Arg Gly Val Pro Thr Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala
90 95 100 105

att tta gca ggc gac aca ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca 568
Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr
110 115 120

Sequenzprotokoll.txt

| | |
|--|------|
| aag tgc gat gtt gag agc gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu | 616 |
| 125 130 135 | |
| tcg gac gtt tgc ata aaa ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser | 664 |
| 140 145 150 | |
| ttt gag aaa aag gag agc gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val | 712 |
| 155 160 165 | |
| gag ctg aag acc gga gtg ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala | 760 |
| 170 175 180 185 | |
| gtg ctt ttt ggg gag agc gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr | 808 |
| 190 195 200 | |
| gga gtt ctt agc ggt att ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp | 856 |
| 205 210 215 | |
| g act gag gag acc gga aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly | 904 |
| 220 225 230 | |
| aag aaa acc ctg att gtc ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu | 952 |
| 235 240 245 | |
| aag acg ttt gga aag gaa aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp | 1000 |
| 250 255 260 265 | |
| atc gaa aag tta aga gag tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met | 1048 |
| 270 275 280 | |
| gca aga aag atg gct gaa gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro | 1096 |
| 285 290 295 | |
| gaa agc aaa gcc aag gaa aca ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val | 1144 |
| 300 305 310 | |
| aca aga aaa aag tga aagcttcaat tgcattgctct agatgatcaa agaattcctg Thr Arg Lys Lys | 1199 |
| 315 | |
| gcctagtcta taggagggttt tgaaaagaaa ggagcaataa tcattttctt gttctatcaa | 1259 |
| gagggtgcta ttgctccttt ctttttttct cgag | 1293 |

<210> 37

<211> 317

<212> PRT

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 37

Sequenzprotokoll.txt

Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala
1 5 10 15

Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala
20 25 30

Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile
35 40 45

Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile
50 55 60

Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His
65 70 75 80

Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val
85 90 95

His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu
100 105 110

Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu
115 120 125

Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile
130 135 140

Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val
145 150 155 160

Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu
165 170 175

Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu
180 185 190

Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly
195 200 205

Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys
210 215 220

Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile
225 230 235 240

Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys
245 250 255

Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys
260 265 270

Sequenzprotokoll.txt

Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu
275 280 285

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr
290 295 300

Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys
305 310 315

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 38

gagctcttca ttatttcgat ttgatttcg tgacc

35

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(44)

<223>

<400> 39

aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact

44

<210> 40

<211> 653

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

Sequenzprotokoll.txt

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

<223>

```

<400> 40
gagctcttca ttatttcgat ttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttgttgtg      60
taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt      120
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatactctga gagacgatat cattgattat      180
ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa      240
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggagggg tgactccatg tcaaaataga      300
gtcataaga ggcccatcaa taagtgcctg agccattag ctagcccagt aactaccaga      360
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt ttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag      420
gcgcatgaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact      480
tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatatc      540
tcccgcataat ctttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga      600
tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt          653

```

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

```

<400> 41
gagctcactc actgatttcc attgcttg      28

```

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

Sequenzprotokoll.txt

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 42
aagcttgagc tctttgttga agagatttgg

30

<210> 43

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 43
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 44

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 44
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 45

<211> 783

Sequenzprotokoll.txt

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(783)

<223>

```

<400> 45
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt    60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga    120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga    180
aaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta    240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaagggc aaatccggga aattattgta    300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca    360
tatatatctc tttcttctta tttcccaa ataacagacaa aagtagaata ttggctttta    420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttactttag ggtaagtgc    480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt    540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta    600
tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt    660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact    720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaadc tcttcaacaa agagctcaag    780
ctt

```

<210> 46

<211> 804

<212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 46

Sequenzprotokoll.txt

| | |
|---|-----|
| atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 1 5 10 15 | 48 |
| cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30 | 96 |
| ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45 | 144 |
| tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu 50 55 60 | 192 |
| ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu 65 70 75 80 | 240 |
| ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His 85 90 95 | 288 |
| tc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala 100 105 110 | 336 |
| ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu 115 120 125 | 384 |
| gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn 130 135 140 | 432 |
| aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160 | 480 |
| cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175 | 528 |
| aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180 185 190 | 576 |
| gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195 200 205 | 624 |
| tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 215 220 | 672 |
| cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225 230 235 240 | 720 |
| ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245 250 255 | 768 |
| cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260 265 | 804 |

Sequenzprotokoll.txt

<210> 47

<211> 267

<212> PRT

<213> Synechococcus WH8102

<400> 47

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

er Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
210 215 220

Sequenzprotokoll.txt

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
260 265

<210> 48

<211> 804

<212> DNA

<213> Künstliche Variante

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 48

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | aaa | acg | aca | aga | tct | att | tcg | tgg | cca | tcg | act | tgc | tgg | cat | cac | 48 |
| Met | Lys | Thr | Thr | Arg | Ser | Ile | Ser | Trp | Pro | Ser | Thr | Cys | Trp | His | His | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| cag | ccg | agt | tgc | tca | agc | tgg | gtg | gca | aat | gag | ttc | agc | cct | cag | gcc | 96 |
| Gln | Pro | Ser | Cys | Ser | Ser | Trp | Val | Ala | Asn | Glu | Phe | Ser | Pro | Gln | Ala | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctc | aaa | ggg | ttg | gct | ctg | gct | ggg | ctg | att | gga | tca | gcc | tgg | ctg | ctc | 144 |
| Leu | Lys | Gly | Leu | Ala | Leu | Ala | Gly | Leu | Ile | Gly | Ser | Ala | Trp | Leu | Leu | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| c | ctg | ggc | ctg | agc | tac | acc | ctg | cca | ctt | gat | cag | acg | cct | ggg | ctg | 192 |
| r | Leu | Gly | Leu | Ser | Tyr | Thr | Leu | Pro | Leu | Asp | Gln | Thr | Pro | Gly | Leu | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ttg | att | ggc | agc | ttg | att | ctg | tgg | cag | acc | ttt | ctg | cac | acc | ggg | ctg | 240 |
| Leu | Ile | Gly | Ser | Leu | Ile | Leu | Trp | Gln | Thr | Phe | Leu | His | Thr | Gly | Leu | |
| 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ttc | atc | gtt | gcc | cac | gat | tcc | atg | cac | gcc | agt | ctg | gtt | ccg | ggg | cat | 288 |
| Phe | Ile | Val | Ala | His | Asp | Ser | Met | His | Ala | Ser | Leu | Val | Pro | Gly | His | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ccc | gga | ttg | aac | cgc | tgg | atc | ggc | aaa | gtg | tat | ttg | ttg | gtg | tat | gca | 336 |
| Pro | Gly | Leu | Asn | Arg | Trp | Ile | Gly | Lys | Val | Tyr | Leu | Leu | Val | Tyr | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ggc | ttg | tct | tat | gag | cgt | tgt | tcc | cgc | aac | cac | aga | cgt | cat | cac | ctg | 384 |
| Gly | Leu | Ser | Tyr | Glu | Arg | Cys | Ser | Arg | Asn | His | Arg | Arg | His | His | Leu | |
| | | 115 | | | | 120 | | | | | | 125 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gca | ccg | gag | acg | ttc | cag | gat | cct | gac | tac | caa | cgt | tgc | acc | aat | aac | 432 |
| Ala | Pro | Glu | Thr | Phe | Gln | Asp | Pro | Asp | Tyr | Gln | Arg | Cys | Thr | Asn | Asn | |

Sequenzprotokoll.txt

| 130 | 135 | 140 | |
|---|-----|-----|-----|
| aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160 | | | 480 |
| cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175 | | | 528 |
| aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp 180 Leu Pro Ala Gln 185 Met His Leu Leu Leu Phe Ser 190 | | | 576 |
| gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro 195 Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe 205 Leu Val Gly Thr 200 | | | 624 |
| tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly 215 Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 220 | | | 672 |
| cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe 235 Ala Ala Cys Tyr Asn 230 240 | | | 720 |
| ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg 245 Glu His His Glu Ser 250 Pro Ser Thr Pro Trp Phe 255 | | | 768 |
| cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260 265 | | | 804 |

<210> 49

<211> 267

<212> PRT

<213> Künstliche Variante

<400> 49

1 t Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
Seite 55

Sequenzprotokoll.txt

85

90

95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
 100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
 115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
 130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
 210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
 260 265

<10> 50

<211> 804

<212> DNA

<213> künstliche Variante

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 50

Sequenzprotokoll.txt

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| atg Met 1 | aaa Lys | acg Thr | aca Thr | aga Arg 5 | tct Ser | att Ile | tcg Ser | tgg Trp | cca Pro 10 | tcg Ser | act Thr | tgc Cys | tgg Trp | cat His 15 | cac His | 48 |
| cag Gln | ccg Pro | agt Ser | tgc Cys 20 | tca Ser | agc Ser | tgg Trp | gtg Val | gca Ala 25 | aat Asn | gag Glu | ttc Phe | agc Ser | cct Pro 30 | cag Gln | gcc Ala | 96 |
| ctc Leu | aaa Lys | ggg Gly 35 | ttg Leu | gct Ala | ctg Leu | gct Ala | ggg Gly 40 | ctg Leu | att Ile | gga Gly | tca Ser | gcc Ala 45 | tgg Trp | ctg Leu | ctc Leu | 144 |
| tcc Ser | ctg Leu 50 | ggc Gly | ctg Leu | agc Ser | tac Tyr | acc Thr 55 | ctg Leu | cca Pro | ctt Leu | gat Asp | cag Gln 60 | acg Thr | cct Pro | ggg Gly | ctg Leu | 192 |
| ttg Leu 65 | att Ile | ggc Gly | agc Ser | ttg Leu | att Ile 70 | ctg Leu | ctc Leu | aga Arg | gca Ala | ttt Phe 75 | ctg Leu | cac His | acc Thr | ggg Gly 80 | ctg Leu | 240 |
| ttc Phe | atc Ile | gtt Val | gcc Ala | cac His 85 | gat Asp | tcc Ser | atg Met | cac His | gcc Ala 90 | agt Ser | ctg Leu | gtt Val | ccg Pro | ggg Gly 95 | cat His | 288 |
| tc Pro | gga Gly | ttg Leu | aac Asn 100 | cgc Arg | tgg Trp | atc Ile | ggc Gly | aaa Lys 105 | gtg Val | tat Tyr | ttg Leu | ttg Leu | gtg Val 110 | tat Tyr | gca Ala | 336 |
| ggc Gly | ttg Leu | tct Ser 115 | tat Tyr | gag Glu | cgt Arg | tgt Cys | tcc Ser 120 | cgc Arg | aac Asn | cac His | aga Arg | cgt Arg 125 | cat His | cac His | gga Gly | 384 |
| cat His | cct Pro 130 | ggt Gly | act Thr | gat Asp | tta Leu | gat Asp 135 | cct Pro | gac Asp | tac Tyr | caa Gln | cgt Arg 140 | tgc Cys | acc Thr | aat Asn | aac Asn | 432 |
| aac Asn 145 | atc Ile | cta Leu | gat Asp | tgg Trp | tat Tyr 150 | gtt Val | cac His | ttc Phe | atg Met | ggc Gly 155 | aac Asn | tat Tyr | ctg Leu | ggc Gly | atg Met 160 | 480 |
| cgg Arg | caa Gln | ctg Leu | tta Leu | aat Asn 165 | cta Leu | agc Ser | tgt Cys | ctt Leu | tgg Trp 170 | ctg Leu | gcg Ala | cta Leu | atc Ile 175 | att Ile | ctc Leu | 528 |
| aac Asn | ggt Gly | tct Ser | gat Asp 180 | ctc Leu | cct Pro | gct Ala | cag Gln 185 | atc Ile | atg Met | cat His | ctg Leu | ctg Leu | ttg Leu 190 | ttc Phe | agc Ser | 576 |
| gtt Val | ctg Leu | ccg Pro 195 | ttg Leu | atc Ile | atc Ile | agt Ser | tcc Ser 200 | tgt Cys | caa Gln | ttg Leu | ttt Phe | cta Leu 205 | gtg Val | gga Gly | acc Thr | 624 |
| tgg Trp 210 | tta Leu | ccc Pro | cac His | cga Arg | cgt Arg | ggg Gly 215 | gcc Ala | acg Thr | aca Thr | cga Arg | ccg Pro 220 | ggc Gly | gtg Val | aca Thr | acg Thr | 672 |
| cgc Arg 225 | agc Ser | ctg Leu | gct Ala | ttg Leu | cat His 230 | cca Pro | gcc Ala | ctc Leu | tct Ser | ttc Phe 235 | gca Ala | gct Ala | tgt Cys | tac Tyr | aac Asn 240 | 720 |
| ttt Phe | ggc Gly | tat Tyr | cat His | cgt Arg 245 | gaa Glu | cat His | cat His | gaa Glu | tcg Ser 250 | cct Pro | tcc Ser | aca Thr | ccc Pro | tgg Trp 255 | ttt Phe | 768 |
| cag Gln | ctg Leu | cca Pro 260 | caa Gln | ctt Leu | cga Arg | aat Asn | gaa Glu | tca Ser 265 | ttc Phe | act Thr | tga | | | | | 804 |

Sequenzprotokoll.txt

<210> 51

<211> 267

<212> PRT

<213> Künstliche Variante

<400> 51

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

er Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly
115 120 125

His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
210 215 220

Sequenzprotokoll.txt

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
260 265

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

Abbildung 1

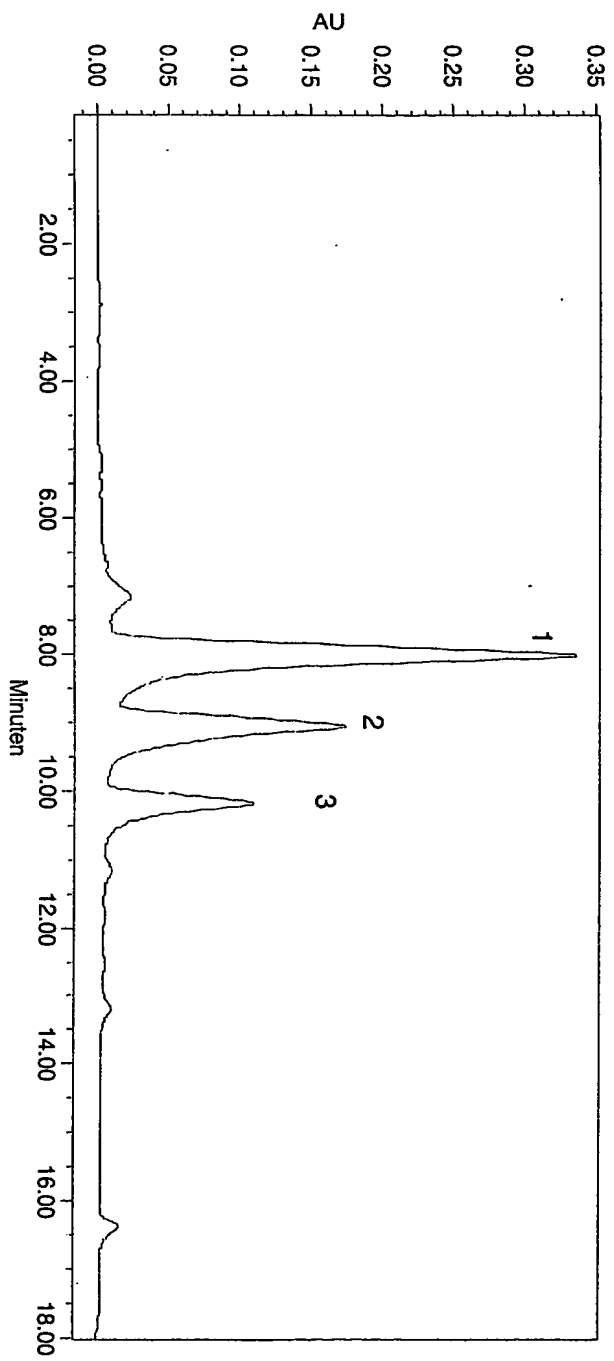


Abbildung 2

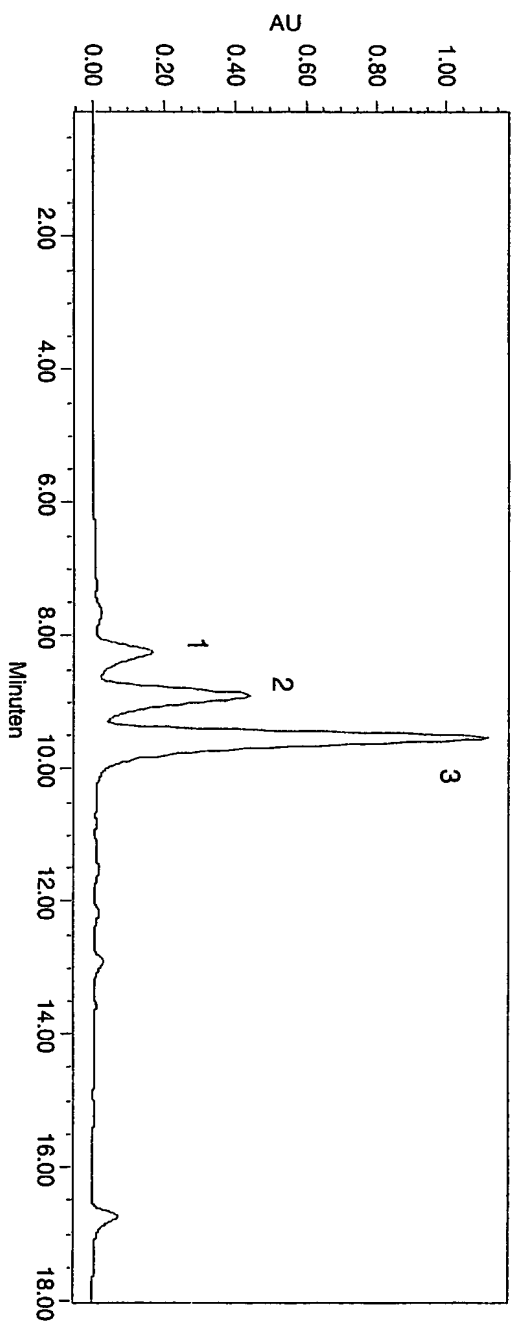


Abbildung 3

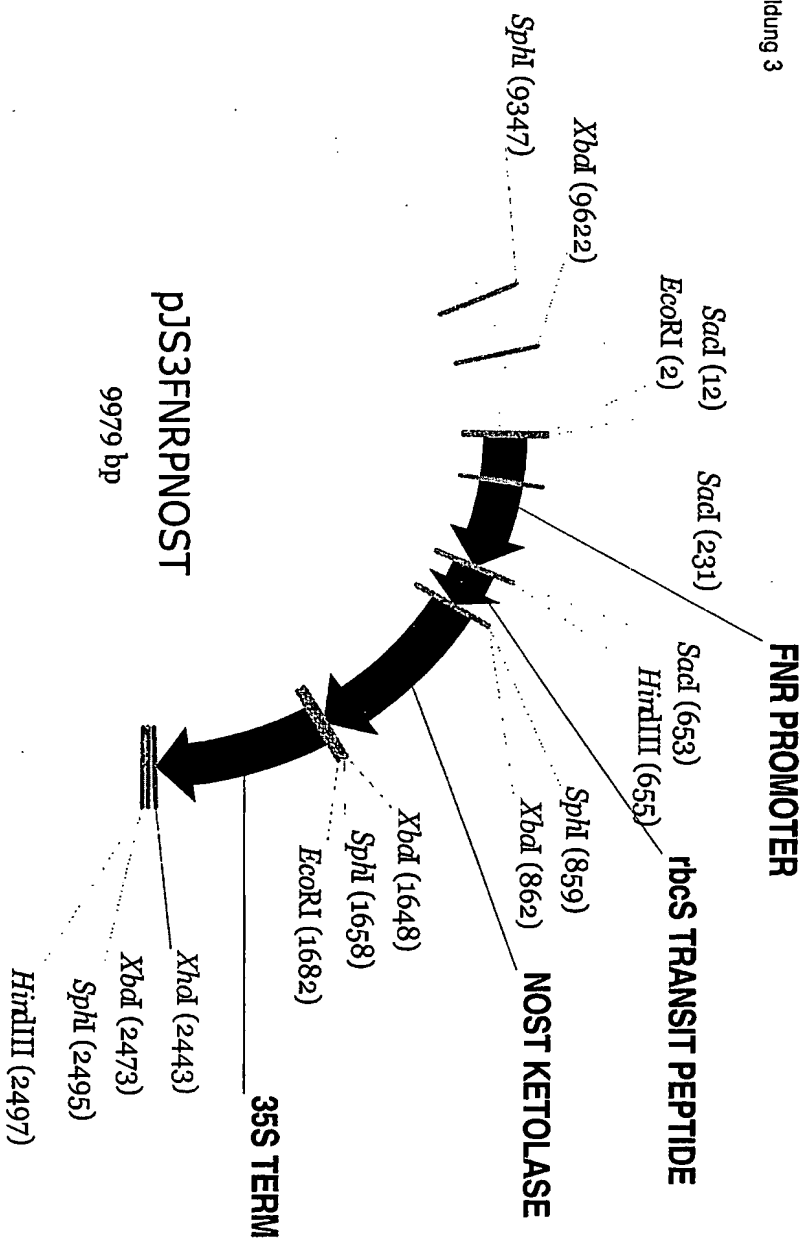


Abbildung 4

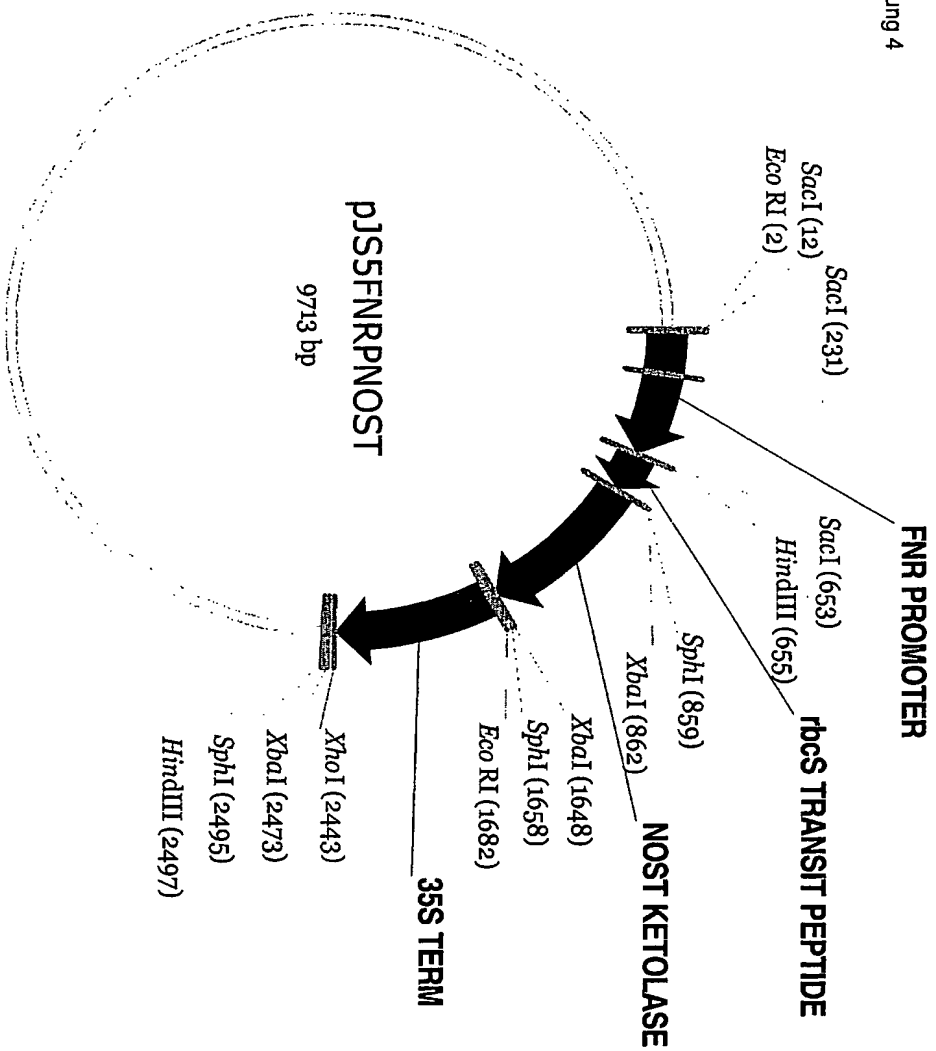


Abbildung 5

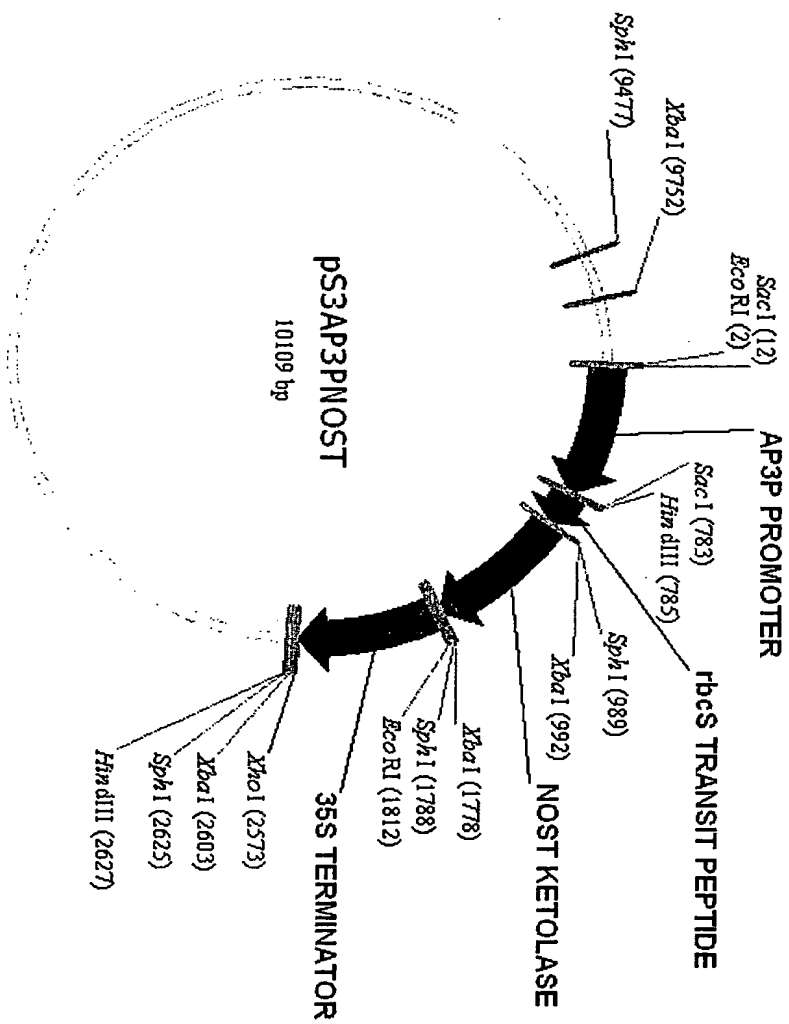
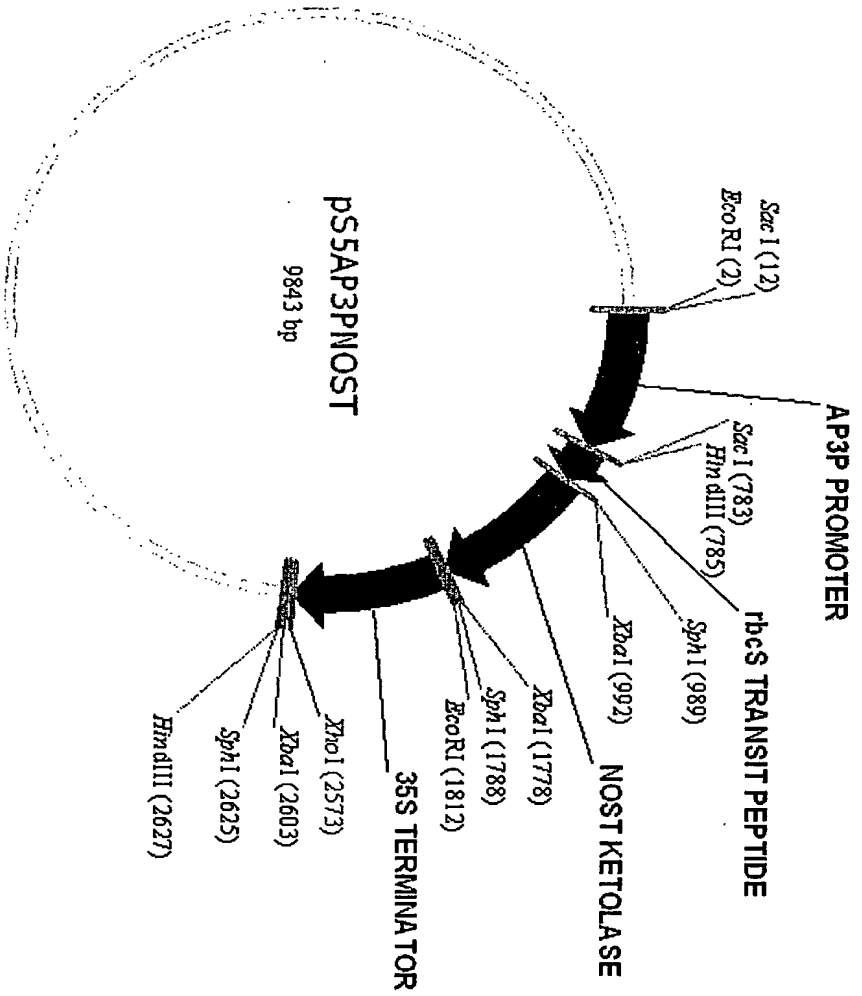


Abbildung 6



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.